

Zur Identifikation oraler Laktobazillen mit MALDI-TOF-MS

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae
(Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Thomas Fiege
geboren am 20.02.1982 in Arnsberg

Jena 2009

Gutachter:

1. _____

2. _____

3. _____

Tag der öffentlichen Verteidigung: _____

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

		Seite
1	Zusammenfassung	1
2	Kariesätiologische Bedeutung der Laktobazillen	2
3	Zielstellung	15
4	Material und Methoden	16
4.1	Bakterienstämme	16
4.2	Anzucht der Stämme zur Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS	19
4.3	Identifizierung der Stämme anhand von MALDI-TOF-MS	20
4.3.1	Externe Kalibrierung des MALDI-TOF-MS	20
4.3.2	Messung der Referenzstämme und klinischen Isolate	21
4.3.3	Analyse der Messergebnisse mit MS-Screener 1.1	23
4.3.4	Identifizierung der klinischen Isolate	24
5	Ergebnisse	25
5.1	Aufbau der Datenbank mit Referenzstämmen	25
5.2	Identifikation der klinischen Isolate auf Spezies- und Subspeziesebene	31
5.3	Vorkommen von Laktobazillen in kariösen Progressionsstadien	37
6	Diskussion	42
6.1	Zur Identifikation von Laktobazillen	42
6.2	Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)	46
6.2.1	Einsatz von MALDI-TOF-MS zur Identifizierung von Mikroorganismen	47
6.2.2	Einsatz von MALDI-TOF-MS zur Identifizierung oraler Laktobazillen	48
6.3	Laktobazillen im kariösen Dentin	52
7	Schlussfolgerungen	56
8	Literaturverzeichnis	57

9	Anhang	65
	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	
	Verwendete Rezepturen	
	Verwendete Chemikalien	
	Lebenslauf	
	Ehrenwörtliche Erklärung	
	Danksagung	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Tab.	Tabelle
s.	signifikant
n. s.	nicht signifikant
n	Anzahl
h	Stunde/Stunden
U	Anzahl der Umdrehungen
min	Minute
ATP	Adenosintriphosphat
CFU	Kolonie bildende Einheit (Colony Forming Unit)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, BRD)
L.	Lactobacillus
NCTC	National Collection of Typ Cultures (London, England)
ATCC	American Type Culture Collection (Manassas, USA)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA Methode
REA	Restriktionsendonukleaseanalyse
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
ss	Subspezies
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR
MALDI-TOF-MS	Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-massenspektrometrie (Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry)
ICM-MS	Intact-cell MALDI-TOF-MS
s/n	Signal/Hintergrundrauschen (signal/noise)
ppm	Teile pro Million (parts per million)
Da	Da (Masseneinheit)
HDPR	Half-Decimal-Places-Rule
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-Dihydroxybenzoic acid)
ACN	Acetylnitril

Abkürzungsverzeichnis

TFA	Trifluoressigsäure
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
m/z	Verhältnis Masse zu Ladungszahl

1 Zusammenfassung

Mit 20 Referenzstämmen von Laktobazillen der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, BRD) wurde mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie eine massenspektrometrische Datenbank aufgebaut. Diese bestand aus den Spektren der mit Trypsin verdauten Proteine der Referenzstämmen. Die Spektren wurden auf maximal 80 Peaks normiert. Auf dieser Grundlage konnten 81 von 90 klinische Isolate von Laktobazillen aus kariösem Dentin (Heinrich und Kneist 1986) bis zur Art bzw. Subspeziesebene identifiziert werden. Die Massenspektroskopie in Verbindung mit ausgewählten wenigen physiologischen und biochemischen Merkmalen der Stämme (Katalasereaktion, Laufstrecke D- und L-Lactatdehydrogenase, Bildung von L-, D- oder DL-Milchsäure aus Glukose, Säurebildung aus Amygdalin, Cellobiose, Mannitol, Melezitose, Raffinose, Rhamnose und Sorbitol) könnte als neue und objektive Methode zur Identifizierung von oralen Laktobazillen in die orale Mikrobiologie eingeführt werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass *L. rhamnosus* am häufigsten in allen kariösen Progressionsstadien anzutreffen ist und dies am häufigsten auch allein. *L. rhamnosus* zeichnet sich durch die Bildung einer Schleimkapsel aus extrazellulären Polysacchariden aus, die die Virulenz der Laktobazille unterstreicht. *L. rhamnosus* unterscheidet sich von *L. paracasei* ss *paracasei* durch die Säureproduktion aus Rhamnose. Als weitere Arten konnten *L. paracasei* ss *tolerans*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. gasseri* und *L. alimentarius* nachgewiesen werden.

Im erweichten kariösen Dentin dominierten Laktobazillen zu 70% die Mikroflora; ihr Nachweis gelang in 13 von 35 Molaren. Nach Kariesexkavation konnten sie am harten Kavitätenboden noch in 14 von 70 Molaren nachgewiesen werden; nach 11,2 Monaten klinischer Beobachtung überlebten sie nur noch in sechs von 70 Molaren. Die massenspektrometrischen Identifizierungen haben gezeigt, dass *L. rhamnosus*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. paracasei* ss *tolerans*, sowie *L. gasseri* im erweichten Dentin überwiegen. Am harten Kavitätenboden nach 11,2 Monaten klinischer Beobachtung dominieren hingegen nur noch *L. rhamnosus* und mit geringerer Prävalenz *L. paracasei* ss *tolerans*. *L. rhamnosus* dürfte ätiopathogenetisch in Anlehnung an die Befunde von Heinrich und Kneist (1986) für die pulpagerichtete Kariesprogression und pulpale Entzündungen verantwortlich sein, wenn bei undichtem Kavitätenverschluss Nährsubstrat für das Überleben von *L. rhamnosus* zur Verfügung steht.

2 Kariesätiologische Bedeutung der Laktobazillen

Karies ist eine der am weitesten verbreiteten und zugleich auch eine der ältesten Krankheiten des Menschen. Nach Hellwig et al. (1999) ist die Zahnkaries eine „lokalisierte, unspezifische, opportunistische Infektionserkrankung mit einer speziellen zivilisationsbedingten Komponente“. Bei nicht erfolgter Beseitigung der Ursache mündet sie in einen irreversiblen Verlust des betroffenen Zahnes. Dieser wird vor allem durch Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten herbeigeführt.

Eng verbunden mit der Forschung nach den beteiligten Mikroorganismen ist die Frage nach den erforderlichen Eigenschaften kariesauslösender Keime. Die fördernden Faktoren sind eine ausgebildete Azidogenität sowie Azidophilie. Die kariogenen Mikroorganismen produzieren also ausgeprägt Säuren, vor allem Milchsäuren, und können im selbst geschaffenen sauren Milieu überleben. Di- und Monosaccharide aus der Nahrung dienen als Substrate zur Produktion von Säuren. Um an der Zahnoberfläche haften zu können, bilden sie aus Zuckern extrazelluläre Polysaccharide. Diese Eigenschaft wird besonders den Mutans-Streptokokken zugeschrieben, die eine besondere Bedeutung bei der Auslösung kariöser Läsionen haben. Dem gegenüber sind Laktobazillen Schleimhautparasiten, denen die Fähigkeit zur Adhärenz fehlt. Ihre Rolle in der Kariespathogenese konzentriert sich daher auf die Progression der Karies. Seit den Arbeiten von Keyes (1962) und König (1971) wird im Rahmen der Kariesätiologie ein multifaktorielles Ursachengefüge anerkannt (Abb. 1).

Dem Menschen wird in diesem Modell die Rolle des Wirts zugeschrieben, an dessen Zähnen es bei entsprechendem Zusammenspiel der Faktoren Bakterien, Substrat und Zeit zur Entstehung von Karies kommt. Der Speichel verfügt über eine Spülfunktion, zeigt antimikrobielle Aktivität und besitzt sowohl die Fähigkeit zur Pufferung von Säuren als auch zur Remineralisation der Zahnhartsubstanz. Er stellt daher ein natürliches Schutzsystem zur Verhinderung der Karies dar (Larmas 1985, Hellwig et al. 1999).

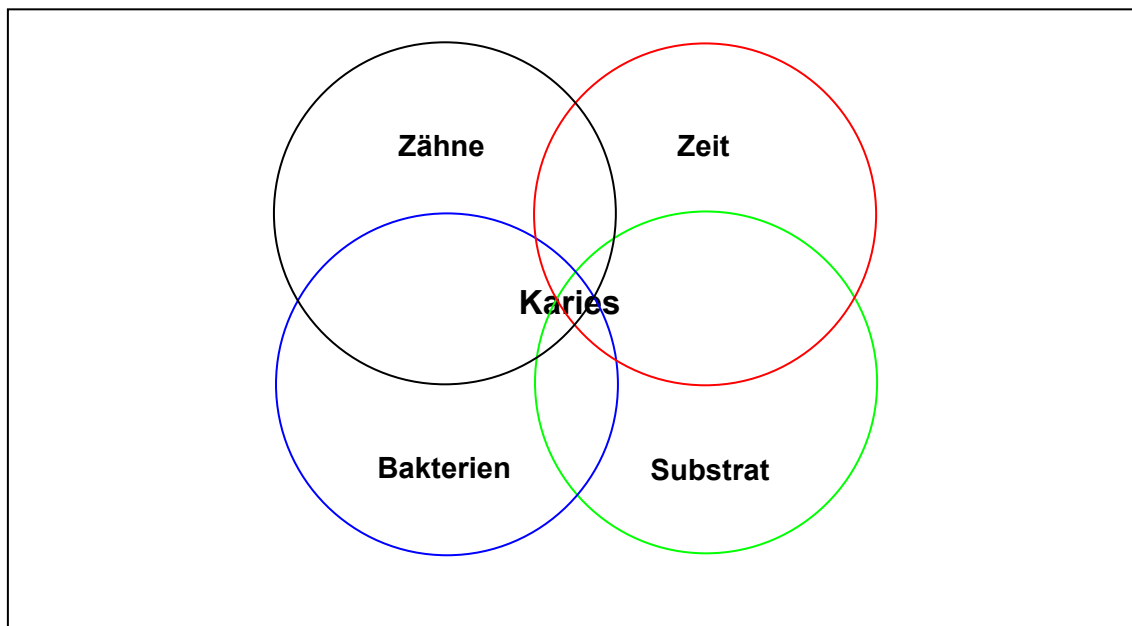


Abbildung 1: Schema der Kariesätiologie nach Keyes (1962) und König (1971)

In der Vergangenheit wurden verschiedene Kariestheorien diskutiert, die als Krankheitsursache Säfte, Würmer, Parasiten oder Keime ansahen (Bridgeman 1863, Magitots 1867, Abbott 1879, Black 1886 und 1914), letztlich aber wissenschaftlich nicht haltbar waren. Einen Fortschritt stellte die chemo-parasitäre Kariestheorie von Miller (1889) dar. Wenn sie auch in toto nicht ohne Widerspruch bleiben konnte, so bedeutete ihr Grundprinzip doch einen Fortschritt. Miller (1889) vertrat die Ansicht, dass die von Mikroorganismen der Mundhöhle aus Zuckern gebildeten Säuren zu einer Entkalkung der Zahnhartsubstanz führen, in deren Folge kariöse Läsionen entstehen. Dieses Prinzip gilt bis heute.

In der Folge wurden in der Wissenschaft neben Protozoen und Würmern vor allem Laktobazillen und Streptokokken als auslösende Keime der Karies diskutiert. Trotz Isolation und Beschreibung von *Streptococcus mutans* durch Clark (1924) galten Laktobazillen bis zu Beginn der 1960er Jahre als hauptverantwortliche Keime für die Entstehung und Progression der Karies. Ein Grund für diese Sichtweise liegt nach heutiger Erkenntnis darin, dass Laktobazillen in den früher mehrheitlich unversorgten Kavitäten ihren Lebensraum hatten und somit gehäuft aus Speichel isoliert werden konnten. Daraus allein ließ sich aber noch nicht ableiten, dass sie auch für die Entstehung dieser kariösen Kavitäten verantwortlich waren. Erst mit der Entwicklung der keimfreien Versuchstiertechnik konnten Laktobazillen aus dem

Ursachengefüge der Kariesentstehung weitestgehend ausgeschlossen und Mutans-Streptokokken als die bedeutsamsten Mikroorganismen erkannt werden (Orland et al. 1954, 1955, Hamada und Slade 1980, Van Houte 1980, Loesche 1986). In gnotobiotischen und konventionellen Tierversuchen konnte in Versuchstieren bei Verabreichung einer zuckerhaltigen Diät und gleichzeitiger Infektion mit Streptokokken Karies ausgelöst werden (Orland et al. 1954, 1955, Michalek et al. 1981, Seppä 1987).

In weiteren gnotobiotischen Tierversuchen gelang es Fitzgerald et al. (1966) und Michalek et al. (1981), mit Laktobazillen Fissurenkaries auszulösen. Michalek et al. beschrieben 1981 zudem, dass mit Streptokokken und Laktobazillen infizierte gnotobiotische Ratten signifikant weniger kariöse Läsionen aufwiesen als nur mit Streptokokken infizierte Tiere. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei mischinfizierten Tieren Laktobazillen vor allem im Speichel und auf der Zungenoberfläche zu finden waren, während die Streptokokken besonders aus der Plaque isoliert werden konnten.

Nach derzeitiger allgemeiner Auffassung sind Laktobazillen aufgrund ihrer ausgeprägten Eigenschaft als Milchsäureproduzenten mit hauptverantwortlich für die Kariesprogression (Marsh 2006). Sie gelten somit im Gegensatz zu den Mutans-Streptokokken nicht als originäre Initiatorkeime, sondern bestimmen hauptsächlich die Pathogenese in fortgeschrittenen kariösen Läsionen. Bereits in der „Vipeholm-Studie“ (Gustafsson et al. 1954) gelang es nachzuweisen, dass ein hoher und frequenter Zuckerkonsum die kariöse Entwicklung entscheidend beschleunigt. Laktobazillen gelten nach Arbeiten von Gustafsson et al. (1954) und Crossner (1981) sowohl für die Menge an konsumierten Zuckern als auch für die Aufnahmefrequenz als Indikatorkeime. Da ihnen als Schleimhautparasiten keine Möglichkeit zur Adhärenz gegeben ist, benötigen Laktobazillen Nischen, um in der Mundhöhle überleben zu können. Diese sind bestehende kariöse Läsionen als auch Fissuren, in denen sie bei Besiedelung als Kariesauslöser wirken können. Als Hinweis sollen hier die Tierversuche von Michalek et al. aus dem Jahr 1981 genannt sein.

Laktobazillen sind Katalase negativ und sowohl hetero- als auch homofermentativ. Der nachfolgende Überblick zum Vorkommen von Laktobazillen im kariösen Dentin bis in die heutige Zeit bezieht sich auf die zur Zeit der Autoren gültige Nomenklatur der Laktobazillen. Die Taxonomie bzw.

Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse der Laktobazillen ist freilich bis heute im Fluss und war deshalb auch erneut Anliegen der vorliegenden Studie zu ihrem Vorkommen im kariösen Dentin auf der Basis moderner Untersuchungsmethoden.

Nach Shovlin und Gillis (1969, 1972) kommen in der Mundhöhle sowie in kariösen Kavitäten hauptsächlich homofermentative Laktobazillenarten vor. Loesche und Syed (1973) verglichen in ihrer mikrobiologischen Untersuchung unter Einbeziehung von sechs Patienten die bakterielle Besiedlung der approximalen Plaque über einer kariösen Läsion mit der des darunterliegenden weichen Dentins. Aus der Plaque konnten 522 und aus dem Dentin 334 Isolate zur weiteren biochemischen Charakterisierung gewonnen werden. Getestet wurden die Katalasereaktion, Nitratreduktion, Gelatineverflüssigung und Indolproduktion, sowie fakultatives aerobes Wachstum. Die Gesamtkeimzahl (CFU/colony forming units) der Plaque bestand zu 17,8% aus Streptokokken, zu 27,1% aus Aktinomyzeten, zu 28,1% aus Veillonellen und zu 4,2% aus Laktobazillen. Im weichen kariösen Dentin stieg der Anteil der Laktobazillen auf 20,8% an. Weiterhin kamen Streptokokken mit 26,6% und Aktinomyzeten mit 18,2% vor. Der Anteil der Veillonellen sank auf 7,3%. Die biochemischen Untersuchungen deuteten auf *L. casei* als dominierende Laktobazille hin.

Edwardsson (1974) dienten 46 extrahierte bleibende Zähne, zumeist Weisheitszähne, zur Untersuchung der bakteriellen Invasionsfront der Dentinkaries. Um das früheste Progressionsstadium der tiefen Dentinkaries erfassen zu können, verwandte Edwardsson (1974) ein äußerst geschicktes methodisches Vorgehen. Die Probenahme erfolgte von zentral über die Pulpa und nicht in Anlehnung an die klinischen Therapieschritte von peripher über die kariöse Läsion. Neben dem eigentlichen Ziel, die Bakterien aus diesem frühen Kariesstadium zu isolieren, zu identifizieren und den relativen Anteil der jeweiligen Art in der CFU zu bestimmen, legte Edwardsson (1974) großes Augenmerk auf den Ausschluss einer Kontamination der gesammelten Dentinproben während der Probengewinnung und ihrer mikrobiologischen Verarbeitung. 220 repräsentative Isolate wurden biochemisch, gaschromatographisch und durch Zellwandanalyse mittels Geldiffusionsanalyse untersucht. Aus 43 Zähnen konnten grampositive Stäbchen und Filamente, darunter aus 22 Zähnen Laktobazillen, nachgewiesen werden. Von 220 Isolaten

wurden 84 als Laktobazillen klassifiziert, wobei 40 als *L. casei* ss *casei* und *L. casei* ss *rhamnosus*, 20 als *L. acidophilus* und *L. salivarius* ss *salivarius* und 21 als *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis* oder *L. buchneri* erkannt wurden. Nur als Laktobazillen konnten 12 Isolate beschrieben werden. Bei 14 Zähnen betrug der Anteil der Laktobazillen an der Gesamtkeimzahl über 50%. Bei der Hälfte der Zähne waren *L. casei* ss *casei* und *L. casei* ss *rhamnosus* die dominierenden Arten. Als mögliche Kontaminationskeime konnte Edwardsson (1974) Mikrokokken, Bazillen und Propionibakterien bestimmen.

Unter striktem anaeroben Vorgehen isolierte Hoshino (1985) obligat anaerobe Mikroorganismen aus oberflächlichem und tiefem kariösen Dentin von vier extrahierten Weisheitszähnen. Die Proben sowie Kontrollen aus intaktem Dentin wurden auf Hirn-Herz-Agar anaerob angezüchtet und anschließend, basierend auf dem „Anaerobe Laboratory Manual“ (Holdeman et al. 1977), identifiziert. Von 275 repräsentativen Isolaten erwiesen sich 221 als obligat und 53 als fakultativ anaerob. Ein Isolat ging im Lauf der Untersuchung verloren. Unter den obligat anaeroben Isolaten wurden vornehmlich Propionibakterien (52 Isolate), Eubakterien (51 Isolate), *Arachnia* (39 Isolate), Laktobazillen (26 Isolate), Bifidobakterien (19 Isolate) und Aktinomyzeten (13 Isolate) sowie mit geringerem Vorkommen Peptokokken (8 Isolate), Clostridien (4 Isolate), *Bacteroides* (2 Isolate), *Peptostreptokokken* (2 Isolate), Streptokokken (2 Isolate) und Fusobakterien (1 Isolat) nachgewiesen. Von 26 Laktobazillen-isolaten konnten neun als *L. minutus*, acht als *L. plantarum*, drei als *L. catenaforme* und *L. crispatus*, sowie jeweils ein Isolat als *L. brevis* und *L. cellobiosus* identifiziert werden. Ein Isolat wurde nicht bis zur Art differenziert. Laktobazillen und Propionibakterien konnten in jeder Kavität, sowohl im oberflächlichen als auch im tiefen Bereich der Dentinkaries, nachgewiesen werden.

Kidd et al. (1993) untersuchten weiches und hartes Dentin von 204 bleibenden Zähnen mit Primär- oder Sekundärkaries während und nach Kariesexkavation. Die Therapie wurde als beendet betrachtet, wenn kein verfärbtes und weiches Dentin mehr in der Kavität vorhanden war. Die Autoren bewerteten neben der Dentinkonsistenz (weich und hart), ob die gesammelten Proben dem feuchten oder trockenen sowie verfärbten oder nicht verfärbten Dentin entstammten. Zusätzlich wurde die mikrobiologische Situation im Dentin mit selektiven und

nicht selektiven Nährmedien hinsichtlich des Vorhandenseins von anaeroben Keimen, Mutans-Streptokokken und Laktobazillen untersucht. Nur Mutans-Streptokokken wurden mit biochemischen und physiologischen Testverfahren bis zur Art *S. mutans* und *S. sobrinus* bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Gesamtkeimzahl anaerober Bakterien, Mutans-Streptokokken und Laktobazillen im weichen und feuchten Dentin signifikant höher lag als im trockenen bzw. hart kariös veränderten Dentin. Des Weiteren nahm während der Kariesexkavation die Gesamtkeimzahl an Anaerobiern von mehr als 10^3 CFU im weichen sowie feuchten Dentin auf weniger als 10^2 CFU signifikant ab. Der Verfärbungsgrad des Dentins erwies sich als kein geeignetes Kriterium zur Bestimmung des Infektionsgrades. Die Mikroflora wurde generell von Laktobazillen dominiert. Kidd et al. (1993, 2004) schlossen aus ihren Untersuchungen, dass zur Therapie der Karies die Exkavation des erweichten Dentins ausreichend ist. Hartes, farblich verändertes Dentin mit einer Restbesiedlung von 10^2 bis 10^3 CFU kann belassen werden.

Botha et al. (1998) untersuchten den Speichel und das Dentin von 12 kariesfreien (DMFT = 0) und von 12 Karies betroffenen Patienten. Durch Anzucht des Untersuchungsgutes auf Rogosaagar konnten 153 Laktobazillenisolat gewonnen werden. 104 Isolate entstammten dem Dentin kariöser Zähne und 49 dem stimulierten Speichel kariesfreier Patienten. Die Autoren konnten mit biochemischen und physiologischen Testverfahren *L. paracasei* (39%), *L. rhamnosus* (31%) und *L. murinus* (16%) als dominierende homofermentative Arten in der von Karies betroffenen Gruppe bestimmen. In der „gesunden Gruppe“ ließen sich in der Mehrzahl *L. rhamnosus* (41%) und *L. paracasei* (30%) identifizieren. Unter den heterofermentativen Keimen dominierte in beiden Untersuchungsgruppen *L. fermentum*.

Ein vergleichbares Vorgehen wählten Marchant et al. (2001) in einer Untersuchung weichen, kariösen Dentins aus 52 Milchzähnen von 14 drei bis fünf Jahre alten Kindern. Plaqueproben der Oberkieferschneidezähne von 14 kariesfreien Kindern standen zum Vergleich zur Verfügung. Laktobazillen wurden auf Rogosaagar angezüchtet und anschließend mittels biochemischer Testverfahren und 16S rRNA-Gensequenzierung bestimmt. Während Laktobazillen in der Plaque nicht beobachtet werden konnten, bildeten sie bis

zu 20% der Mikroflora des kariösen Dentins. Unter ihnen kamen *L. casei* ss *casei*, *L. fermentum* und *L. casei* ss *rhamnosus* am häufigsten vor. Eine Genotypisierung der genannten Stämme wurde an Isolaten je einer Dentinprobe aus zwei Kavitäten von je drei Kindern mit ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR) durchgeführt. Es zeigte sich, dass zwei unterschiedliche Läsionen ein und desselben Kindes von verschiedenen Genotypen einer Spezies besiedelt werden.

Bjørndal und Larsen (2000) untersuchten zuvor die mikrobiellen Veränderungen im kariösen Dentin an neun permanenten Molaren bei schrittweiser Caries-profunda-Therapie. Die Dentinproben wurden auf selektiven und nicht selektiven Nährmedien anaerob angezüchtet. Die CFU des weichen kariösen Dentins bestand vor erstmaliger Kariesexkavation zu 50% aus Laktobazillen und weiterhin aus Aktinomyzeten und Streptokokken. Durch Klassifikation nach biochemischen und physiologischen Eigenschaften konnte *L. casei* ss *rhamnosus*, gefolgt von *L. brevis*, als dominierender Keim bestimmt werden. Weiterhin wurden *L. acidophilus*, *L. plantarum* sowie *L. casei* ss *casei* nachgewiesen. Nach sechsmonatiger Ca(OH)_2 -Einwirkung konnten Laktobazillen vor Exkavation der verbliebenen Karies signifikant weniger häufig im kariösen Restdentin isoliert werden. *L. casei* ss *rhamnosus* und *L. plantarum* waren innerhalb der Laktobazillen weiterhin die vorherrschenden Arten. Am kariesfreien Kavitätenboden dominierten Aktinomyzeten und verschiedene Streptokokkenarten.

Martin et al. (2002) verglichen in einer klinisch-mikrobiologischen Studie die Real-Time PCR als molekulare Untersuchungsmethode mit traditionellen, selektiven und nichtselektiven Nährmedien. Als Untersuchungsgut wurde kariöses Dentin aus 65 extrahierten, bleibenden Molaren herangezogen. Die Zähne wiesen nach Angaben der Autoren vor ihrer Entfernung Zeichen einer reversiblen Pulpitis mit Schmerzen und erhöhter Kälte- und Hitzeempfindlichkeit auf. Die Pulpa war jedoch noch nicht eröffnet. Mit Trypticase-Soja-Agar wurde die Gesamtkeimzahl nach anaerober Anzucht bestimmt. Mitis-salivarius-Agar, Rogosaagar, Cadmium-Fluorid-Akriflavin-Tellurit-Agar, Kanamycin- und Vancomycin-Blutagar und Kristallviolett-Erythromycin-Agar wurden zur selektiven Erfassung von Streptokokken, Laktobazillen, Aktinomyzeten, Prevotellen und Fusobakterien verwendet. Die Untersuchung mit Real-Time

PCR basierte auf der Verwendung eines Universalprimers für Anaerobier sowie spezifischer Primer für *Prevotella*, *Fusobakterien*, *P. melaninogenica*, *P. endodontalis*, *P. gingivalis* und *M. micros*. Die anaerobe Gesamtkeimzahl lag nach kultureller Anzucht im Mittel bei $7,3 \times 10^6$ CFU und bestand hauptsächlich aus grampositiven Bakterien. Unter diesen kamen Laktobazillen am häufigsten vor. Gramnegative Bakterien wurden ebenfalls nachgewiesen. Die mit PCR bestimmte Keimzahl lag um den Faktor 41 höher. Prevotellen und Fusobakterien, als gramnegative Keime, wurden 82- und 2,1-fach häufiger bestimmt als mit klassischen Kulturtechniken. Dasselbe Untersuchungsgut diente Byun et al. (2004) zur weiteren Beschreibung der Mikroflora weit fortgeschrittener Dentinkaries. Mit PCR – unter Verwendung spezifischer und unspezifischer Primer – konnten die Autoren RNA von Laktobazillen aus kariösem Dentin aus allen 65 Molaren identifizieren. 400 Basenpaare wurden vervielfältigt. Da den Autoren keine weitere Differenzierung zwischen *L. casei* ss *casei*, *L. paracasei* und *L. casei* ss *rhamnosus* möglich war, bildeten sie aus den genannten Arten eine *L. casei*-Gruppe. Diese Gruppe kam in 68% der Molaren vor, gefolgt von *L. salivarius* (60%), *L. gasseri* (54%), *L. ultunensis* (52%), *L. crispatus* (45%) und *L. fermentum* (22%). *L. delbrueckii* und *L. gallinarum* wurden nur mit geringer Prävalenz erfasst. Quantitativ konnten mit Real-Time PCR *L. gasseri* und *L. ultunensis* als dominierende Laktobazillen im kariösen Dentin erfasst werden. Chhour et al. (2005) verwandten in einer Folgeuntersuchung eine PCR mit einer Vervielfältigung von 410 bis 430 Basenpaaren zur qualitativen Beschreibung des kariösen Dentins aus zehn extrahierten bleibenden Zähnen. Aus den kariösen Läsionen konnten 75 verschiedene Arten identifiziert werden, wobei bis zu 31 Arten in einer Läsion beobachtet wurden. Laktobazillen und Prevotellen wurden mit hoher Prävalenz nachgewiesen. Weiterhin wurden *Selenomonas*, *Dialister*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium*, *Lachnospiraceae*, *Olsenella*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* und *Pseudoramibacter alactolyticus* aufgefunden. Die weitere Unterteilung der Laktobazillen erlaubte keine Differenzierung zwischen *L. casei* ss *rhamnosus* und *L. casei* ss *casei* sowie *L. panis* und *L. reuteri*. Zusätzlich zu den Gruppen *L. casei/rhamnosus* und *L. panis/reuteri* konnten noch *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii*, *L. ultunensis*, *L. crispatus*, *L. salivarius* und *L. nagelii* identifiziert werden.

Wicht et al. (2004) untersuchten die Wirksamkeit von Cervitec® (Vivadent Ivoclar, Schaan, Liechtenstein) und Ledermix® (Wyeth-Lederle, Wien, Österreich) an je zehn Molaren und Prämolaren mit Dentinkaries bei schrittweiser Kariesexkavation über einen Untersuchungszeitraum von sechs Wochen. Bei der Kontrollgruppe mit ebenfalls zehn kariösen Kavitäten wurde kein antimikrobiell wirkendes Medikament verwendet. Nach Exkavation des weichen Dentins in der ersten Behandlungssitzung sowie nach Entfernung des restlichen kariösen Dentins nach sechs Wochen wurden Proben vom Kavitätenboden zur mikrobiologischen Untersuchung gewonnen. Rogosaagar diente als selektives Medium zur Anzucht von Laktobazillen. Zu Behandlungsbeginn waren Laktobazillen im Durchschnitt mit einer Keimzahl von 10^3 bis 10^4 (CFU) nachweisbar (Kontrollgruppe $1,2 \times 10^3$, Cervitec®-Gruppe $1,62 \times 10^4$, Ledermix®-Gruppe $4,68 \times 10^3$). Die CFU aller Anaerobier betrug 10^5 . Die Anzahl der Laktobazillen reduzierte sich nach sechswöchiger Behandlung mit Cervitec® auf $6,46 \times 10^2$, mit Ledermix® auf 0,15 und in der Kontrollgruppe auf $3,47 \times 10^2$ CFU bei einer jeweiligen Gesamtkeimzahl von $3,24 \times 10^3$, $8,51 \times 10^2$ und $7,59 \times 10^4$. In allen drei Patientengruppen war *L. casei* ss *rhamnosus* am Anfang und am Ende der Behandlung mit einem Anteil von 48,8% bzw. 60% der dominierende Keim innerhalb der Laktobazillen. *L. casei* ss *casei* oder *L. paracasei* vereinten 19,5% bzw. 15% auf sich, gefolgt von *L. buchneri*, *L. delbrueckii* ss *lactis* und *L. viridescens* mit insgesamt 12,2% bzw. 15%.

Aas et al. (2008) bestimmten mit PCR durch 16S rRNA-Gensequenzierung und einem reverse-capture checkerboard assay die bakterielle Flora in Plaqueproben 39 kariesfreier Probanden (14 Milch- und 25 bleibende Zähne) sowie in Plaque und Dentinproben von 51 von Karies betroffener Patienten (15 Milch- und 36 bleibende Zähne). In der an Karies erkrankten Gruppe wurde je eine Plaqueprobe von intaktem Schmelz, einer weißen Läsion sowie vom Rand einer offenen Dentinkaries gewonnen. Zusätzlich wurde bei jedem Probanden während der Kariesexkavation eine Probe weichen Dentins entnommen. In der Probenanalyse konnten 197 Bakterien detektiert werden, von denen 50% mit traditionellen mikrobiologischen Techniken nicht kultivierbar waren. In der statistischen Analyse konnte gezeigt werden, dass *Capnocytophaga granulosa*, Eubakterien und *Streptococcus cristatus* signifikant

häufiger aus der Plaque über gesundem Schmelz vorkamen. Aktinomyzeten und Nicht-Mutans-Streptokokken korrelierten eng mit initialen Läsionen. Die Progressionsstadien der Karies wurden hingegen von Veillonellen, Laktobazillen, Bifidobakterien und Propionibakterien, Mutans- sowie Nicht-Mutans-Streptokokken, Aktinomyzeten und Atopobium dominiert.

Kneist et al. (1998) konnten Laktobazillen neben Aktinomyzeten und Streptokokken als hauptsächliche Keime der Standortflora des Speichels bestimmen. Hingegen wurde die Plaque von Aktinomyzeten und Streptokokken, aber nicht von Laktobazillen dominiert (Tab. 1).

Tabelle 1: Standortflora der Plaque und Standortflora des Speichels bei Erfurter Kindern und Jugendlichen (Kneist et al. 1998)

Standortflora Plaque	Standortflora Speichel
A. naeslundii	A. odontolyticus
S. sanguinis	S. salivarius
S. mutans	S. mutans
S. sobrinus	S. sobrinus
S. oralis	L. paracasei ss paracasei
	L. paracasei ss tolerans
	L. rhamnosus
	L. delbrueckii ss lactis

Im Rahmen letzterer Studie wurde eine repräsentative Sammlung oraler Keime aus Plaque und Speichel von über vier Jahre beobachteten Kindern angelegt. Die Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten aus dieser Sammlung dienten der Überprüfung der Virulenzfaktoren kariogener Mikroorganismen (Bergholz 2002, Baake 2003, Bauer 2004). Hinsichtlich der Azidogenität und Azidophilie nahmen Baake (2003), Bauer (2004) und Bergholz (2002) unter Zuhilfenahme der pH-state-Technik vergleichende Untersuchungen an den am häufigsten isolierten Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten vor (Abb. 2, Abb. 3). Bei den Aktinomyzeten war die Eigenschaft zur Säureproduktion und einhergehend die der Toleranz nach Bauer (2004) am geringsten ausgeprägt. Mutans-Streptokokken erwiesen sich als azidogen und azidophil (Bergholz 2002).

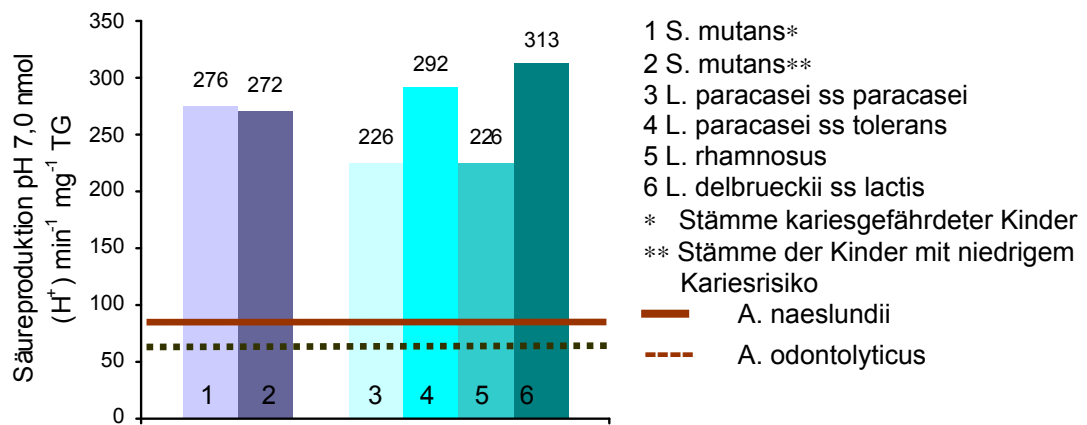


Abbildung 2: Säureproduktion von Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten in vitro bei pH 7,0 (Bergholz 2002, Baake 2003, Bauer 2004)

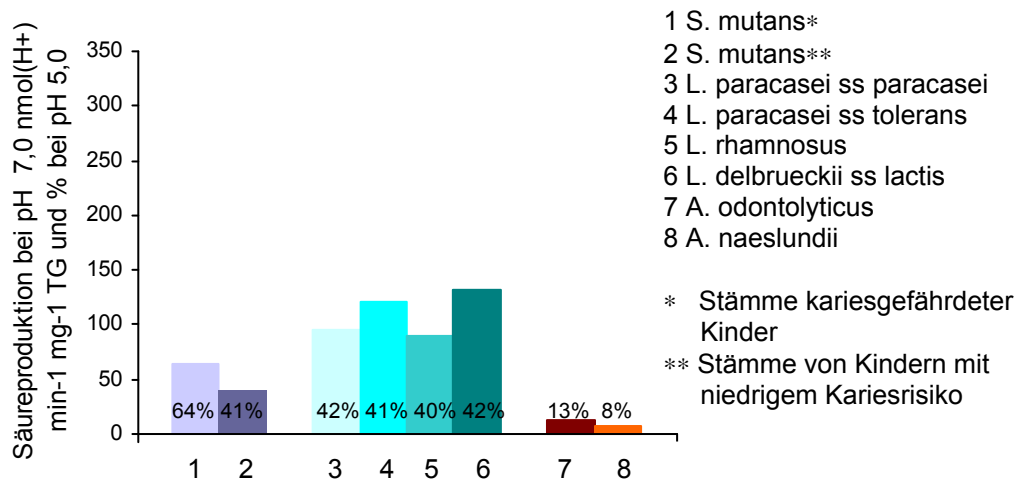


Abbildung 3: Säuretoleranz (% Säureproduktion bei pH 5,0 im Vergleich zu pH 7,0) von Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten in vitro (Bergholz 2002, Baake 2003, Bauer 2004)

Mutans-Streptokokken können bei einem für kariöse Kavitäten typischen pH-Wert von 5,5 (Hellwig 1999) noch 30 – 40% ihrer üblichen Säureproduktion erbringen und treiben somit sowohl in der Initialphase als auch während der Progression den Demineralisationsprozess in der Zahnhartsubstanz voran. Baake (2003) konnte vergleichbare Ergebnisse für die Laktobazillen vorlegen. Dabei wiesen Laktobazillen im Vergleich zu Mutans-Streptokokken eine um eine pH-Einheit höhere Säuretoleranz und damit eine bei pH 5,5 ebenfalls stärkere Säureproduktion auf. Während Mutans-Streptokokken an Glattflächen haften können, fehlt Laktobazillen die Fähigkeit zur Adhärenz an Oberflächen.

Sie kolonisieren bevorzugt biologische Nischen wie die Schleimhäute, Fissuren und unversorgte Kavitäten. Daher werden Mutans-Streptokokken vor allem als Initiatorkeime der Karies verstanden. Hingegen besiedeln Laktobazillen kariöse Läsionen und treiben den Kariesprozess unter Nutzung einer höheren Säureproduktion im niedrigen pH-Bereich voran und können auch Fissurenkaries auslösen (Michalek et al. 1981).

Die Okklusalfächen von Prämolaren und Molaren sind schwer zu reinigen (Nagano 1960, Lussi und Schaffner 2002, Lussi et al. 2003) und bieten somit auch für die eigentlichen Schleimhautparasiten einen hervorragenden Standort (Abb. 4).









Fissuren-anatomie	Kariespräventiv Öffnungswinkel 70 – 90° Selbstreinigung und Hygiene möglich	Nicht kariespräventiv Öffnungswinkel < 70° Keine Selbstreinigung und Hygiene möglich	Häufigkeit
V			34%
U			14%
I			19%
IK			26%
Andere			7%

Abbildung 4: Fissurenmorphologie nach Nagano (1960) (**Locus der Infektion**)

Loesche (1986) wie auch Steiner et al. (1994) konnten aufzeigen, dass die meisten kariösen Prozesse ihren Ursprung in den Fissuren und Grübchen der Molaren und Prämolaren haben. Konsequenterweise wurden nachfolgend verschiedene hier ansetzende Präventionsmaßnahmen untersucht. Dabei erwies sich mit zunehmender Entwicklung und Anwendung von Kompositen die Fissurenversiegelung als die erfolgversprechendste Maßnahme zur Verhinderung von Fissurenkaries (Heinrich-Weltzien 1998).

Heinrich und Kneist (1986) untersuchten in einer klinisch-mikrobiologischen und histologischen Therapiestudie an Erfurter Schulkindern mit Caries profunda das Keimspektrum unterschiedlich entwickelter Progressionsstadien. Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten konnten objektiv identifiziert und ihre Bedeutung für den kariösen Prozess erhellt werden (Heinrich und Kneist 1986, Rupf et al. 2001, Kaetzke et al. 2003). Unter 262 stäbchenförmigen Isolaten wurden auch 147 Laktobazillen gewonnen. Letztere sollten in der vorliegenden Studie einer zeitgemäßen taxonomischen Untersuchung unterzogen werden, um retrospektiv die ätiopathogenetische Bedeutung der Laktobazillen im kariösen Progressionsprozess erneut zu beleuchten.

3 Zielstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten Laktobazillen aus kariösen Progressionsstadien von Milchmolaren mit MALDI-TOF-MS unter Einbeziehung von 20 Referenzstämmen der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, BRD) zeitgemäß identifiziert werden. Die zu identifizierenden klinischen Isolate lagen als lyophilisierte Konserven vor und wurden im Rahmen einer früheren klinisch-mikrobiologischen und histologischen Therapiestudie (Heinrich und Kneist 1986) gewonnen.

Entsprechend der Zielstellung der Arbeit war es zunächst erforderlich, mit Referenzstämmen eine massenspektrometrische Datenbank aufzubauen.

Als Arbeitshypothesen wurden angenommen, dass:

1. die Referenzstämmen zum Aufbau einer Datenbank geeignet sind.
2. sich die MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur objektiven Identifikation oraler Laktobazillen auf der Spezies- und Subspeziesebene eignet.
3. sich ätiopathogenetisch bedeutsame Laktobazillenarten im Progressionsprozess der Dentinkaries im Milchzahn nach Identifizierung der Stämme herauskristallisieren.

4 Material und Methoden

4.1 Bakterienstämme

90 lebensfähige klinische Isolate aus kariösem Dentin von 70 Milchmolaren mit Caries profunda (Abb. 5, Heinrich und Kneist 1986), die nach Voruntersuchungen bereits der Gattung *Lactobacillus* zugeordnet werden konnten, sollten bis zur Art bzw. Subspezies auf der Basis einer massenspektrometrischen Datenbank identifiziert werden. 42 der 90 Isolate stammten aus erweichtem kariösen Dentin und schrittweiser Kariesexkavation in der ersten Sitzung (S) und 48 Isolate aus hart kariös verändertem Dentin nach weiterem schrittweisem bzw. einzeitigem therapeutischen Vorgehen (H1, H2) (Tab. 2).

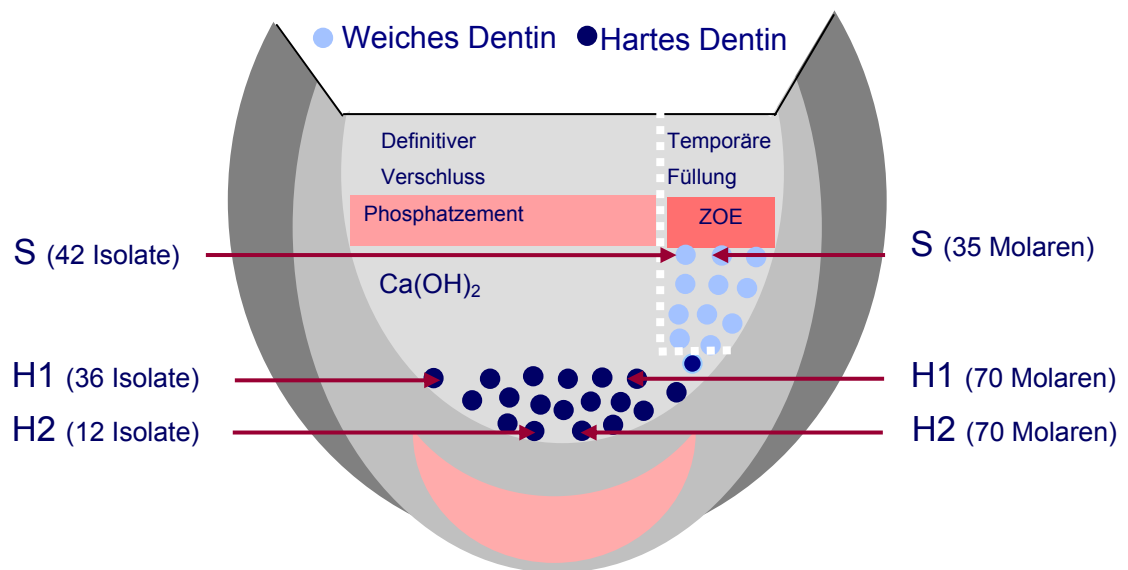


Abbildung 5: Klinisches Vorgehen bei der Caries-profunda-Therapie und Lokalisation der Probenahme von kariös erweichten (S) und harten Dentinspänen nach definitivem Verschluss (H1) sowie nach 11,2 Monaten Beobachtungszeit zur Endkontrolle (H2)

Die Gesamtkeimzahl im erweichten Dentin (S) betrug $3,6 \times 10^5$ CFU und lag damit signifikant über der des harten Kavitätenbodens, der eine Gesamtkeimzahl von $3,7 \times 10^3$ CFU bzw. $0,1 \times 10^3$ CFU zu den Zeitpunkten H1 und H2 aufwies (Tab. 3).

Tabelle 2: Klinische Isolate von Laktobazillen (n = 90) aus erweichtem und hart kariös verändertem Dentin nach Caries-profunda-Therapie und klinischer Beobachtungszeit von 11,2 Monaten

Seriennummern der klinischen Isolate

Erweichtes kariöses Dentin S1 (n = 42)

D58, D93*, D100, D110, D121*, D135, D136, D140*, D155, D156, D158, D229, D253*, D279, D280, D304*, D341, D340, D514, D528*, D529, D566*, D567, D588, D589, D599, D610*, D611*, D623, D624, D626, D627, D639, D641*, D650, D684*, D701*, D702*, D807, D808, D809, D810

Klinisch akzeptables, hart kariös verändertes Dentin H1 (n = 36)

D17, D18, D130*, D131*, D148, D149, D150, D151, D152, D268*, D317*, D318*, D320, D321, D327*, D347, D361*, D370, D375, D403, D410*, D497, D508, D564, D583*, D613*, D616*, D633*, D634*, D678, D679*, D682, D703*, D704, D747, D824*

Hartes Dentin H2 (n = 12) - nach 11,2 Monaten klinischer Beobachtung

D856, D895*, D896*, D923, D938*, D941, D944*, D949*, D959, D961, D962, D989

Nach 2-tägiger aerober* oder 7-tägiger anaerober Bebrütung

Tabelle 3: Gesamtkeimzahlen im erweichten kariösen Dentin (S1) von 35 Milchmolaren und Gesamtkeimzahlen im hart kariös veränderten Dentin vom Kavitätenboden zum Zeitpunkt des definitiven Kavitätenverschlusses (H1) und nach und einer Beobachtungszeit von 11,2 Monaten (H2)

Dentinkonsistenz	Gesamtkeimzahl (x 10 ³ CFU)
Erweichtes kariöses Dentin S	364,3 ± 1000
Hart kariös verändertes Dentin H1 (klinisch akzeptabel)	3,7 ± 13,6
Hart kariös verändertes Dentin H2 (klinisch akzeptabel)	0,1 ± 2,8

* Paardifferenzentest: S : H1 und S : H2 p < 0,05 s., H1 : H2 p > 0,05 ns.

In den Voruntersuchungen wurde das Wachstum der Isolate auf Rogosaagar (Difco, Rogosa et al. 1951) überprüft und mikroskopisch das Gramverhalten und die Morphologie kontrolliert. Die Katalasereaktion wurde überprüft,

elektrophoretisch die Laufstrecke von D- und L-Lactatdehydrogenase, enzymatisch die gebildete Menge der Isomere L, D oder D, L Lactat aus Glukose (UV-Test-Kits L- oder D-Milchsäure, Boehringer, Mannheim) und die Säurebildung aus Amygdalin, Cellobiose, Mannitol, Melezitose, Raffinose, Rhamnose und Sorbitol (Kandler und Weiss 1986). Für die in der vorliegenden Untersuchung vorzunehmende massenspektrometrische Identifizierung lagen die Isolate als lyophilisierte Stammkonserven vor.

20 Referenzstämmen der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig), die repräsentativ für die Mundhöhle sind (Kneist et al. 1998), wurden zunächst zum Aufbau der massenspektrometrischen Datenbank ausgewählt (Tab. 4). Auch die Referenzstämmen lagen in lyophilisierter Form vor und wurden, wie oben dargestellt, in ausgewählten physiologischen und biochemischen Eigenschaften kontrolliert; eine Gensequenzierung der Stämme zur Artbestätigung lag vor (Wicht, persönliche Mitteilung).

Die Reaktivierung der Referenzstämmen und klinischen Isolate für die massenspektroskopischen Untersuchungen, die im Zentrum für Biotechnologie der Universität Oslo/Norwegen vorgenommen wurden, erfolgte in Rogosabouillon. Es wurde eine Arbeitssammlung in MicrobanksTM (Pro-LAB, Ontario, Kanada) angelegt, die bei -18°C gelagert wurde.

Tabelle 4: Auswahl der Referenzstämme von Laktobazillen (n = 20) zum Aufbau einer Datenbank

Stamm-Nummer	Taxon
DSMZ 20079	<i>L. acidophilus</i>
DSMZ 20181	<i>L. alimentarius</i>
DSMZ 20057	<i>L. buchneri</i>
DSMZ 20054	<i>L. brevis</i>
DSMZ 20011	<i>L. casei</i> (vormals <i>L. casei</i> ss <i>casei</i>)
DSMZ 20022	<i>L. rhamnosus</i> (vormals <i>L. casei</i> ss <i>rhamnosus</i>)
DSMZ 20178	<i>L. rhamnosus</i> (vormals <i>L. zeae</i>)
DSMZ 20001	<i>L. coryniformis</i> ss <i>coryniformis</i>
DSMZ 20004	<i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i>
DSMZ 20072	<i>L. delbrueckii</i> ss <i>lactis</i>
DSMZ 20074	<i>L. delbrueckii</i> ss <i>delbrueckii</i>
DSMZ 20080	<i>L. delbrueckii</i> ss <i>bulgaricus</i>
DSMZ 20077	<i>L. gasseri</i>
DSMZ 20008	<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>
DSMZ 5457	<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>
DSMZ 20012	<i>L. paracasei</i> ss <i>tolerans</i>
DSMZ 2601	<i>L. plantarum</i>
DSMZ 20016	<i>L. reuteri</i> (vormals <i>L. fermentum</i>)
DSMZ 20555	<i>L. salivarius</i> (vormals <i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>)
DSMZ 20410	<i>Weissella viridescens</i> (vormals <i>L. viridescens</i>)

4.2 Anzucht der Stämme zur Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS

Zur Reaktivierung und Bearbeitung der Stämme wurden 3 bis 4 Keramikperlen aus den Microbanks mit einer sterilen Impföse in Rogosabouillon (Difco) überführt. Je 2 Kulturröhrchen mit 10 ml Bouillon wurden mit den Stämmen angeimpft und anaerob (VT 5042 EK, Heraeus) bei $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 24 Stunden bebrütet. Die maximale Abweichung der Inkubationszeit wurde mit $\pm 0,5$ Stunden eingehalten. Die Kulturen wurden anschließend im Grampräparat auf ihre Reinheit kontrolliert. Nach der Bebrütung wurden die Kulturansätze vereinigt und 5 min bei 4000 U/min (Megafuge 1.0 Sepatech, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment nachfolgend in PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7) gewaschen und für 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Der Reinigungsschritt wurde anschließend dreimal wiederholt (Abb. 6).



Abbildung 6: Lagerung der Stämme in Microbanks (A) mit Keramikperlen (B), Anzucht der Stämme im Brutschrank (C) in Rogosabouillon (D), Zentrifugieren (E) und Waschen der Biomasse (F)

4.3 Identifizierung der Stämme anhand von MALDI-TOF-MS

4.3.1 Externe Kalibrierung des MALDI-TOF-MS

Die externe Kalibrierung des Ultraflex II Massenspektrometers erfolgte mit einem Peptidgemisch (Tab. 5), das im Verhältnis 1:1 mit 0,5 µl Matrix auf den Probenhalter aufgetragen wurde. Als Matrixlösung wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) (0,5 µl DHB gelöst in 33%igem Acetonitril (ACN) und 0,5%iger Trifluoressigsäure (TFA)) verwendet. Die Messungen wurden im Reflektor-Modus mit einer durchschnittlichen Laserintensität von 30% durchgeführt. Die externe Kalibrierung erfolgte durch Hoch-Präzisions-Kalibration mit FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics, Bremen, BRD).

Tabelle 5: Standardpeptide zur externen Kalibrierung des Massenspektrometers

Peptidname	Masse (Da)
Kemptide	772.47
Bradykinin	1060.57
Substance P	1348.71
Glufib	1570.68
Dynorphin	1984.14

4.3.2 Messung der Referenzstämme und klinischen Isolate

Zur Messung der Referenzstämme und klinischen Isolate wurde nun je 1 µl der Biomasse (Kap. 4.2) der Stämme mit 5 µl eines Verdauungspuffers (4 µl 25 mM Ammoniumbikarbonat mit 1 µl Trypsinlösung 0,25 µg/µl, Promega, Madison, USA) zwei Stunden bei 37°C (Thermomixer Comfort, Eppendorf, BRD) inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 13.000 U/min, Zentrifuge 5415 D, Eppendorf, BRD) wurden 0,5 µl des Überstandes in einem neuen Eppendorfgefäß mit 0,5 µl Matrix (DHB) gemischt und auf einen MALDI-Probenteller (Targetplatte) aufgetragen (Abb. 8). Die anschließende Messung erfolgte mit einem Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, BRD) Massenspektrometer im Reflektor-Modus in einem Massenbereich von 600 bis 4000 Da (Abb. 7).

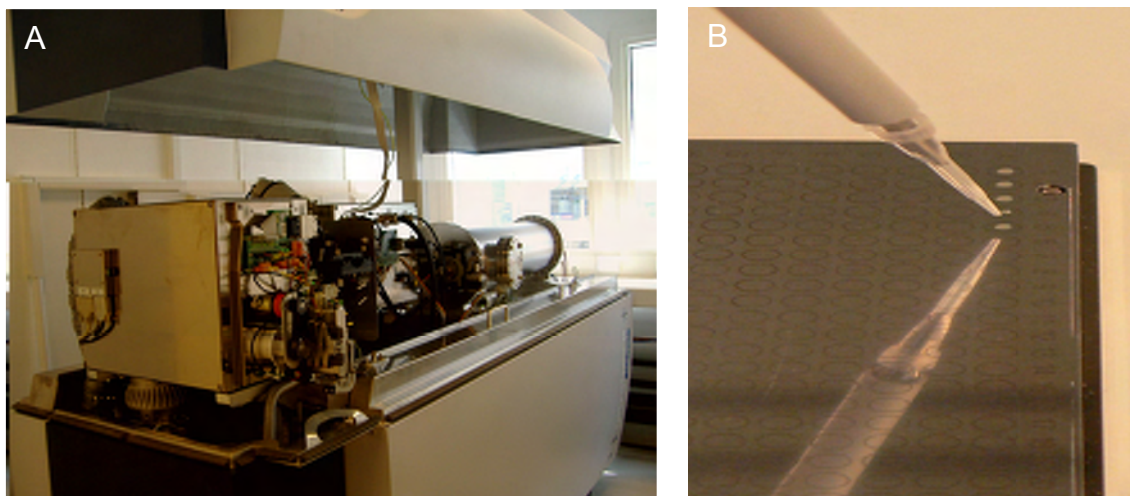


Abbildung 7: Massenspektrometer Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, BRD) (A) und Auftrag der Proben auf den Probenteller (B)

Beim Vermessen der Proben wurden einzelne Massen mit einer maximalen Häufigkeit von 1×10^5 (counts) detektiert.

Pro Referenzstamm wurden drei Messungen von unabhängigen Präparationen durchgeführt. Die klinischen Isolate wurden in einem zweifachen Ansatz vorbereitet und vermessen.

Generell wurde bei der manuellen Messdurchführung versucht, Spektren mit möglichst vielen Massesignalen (Massenpeaks bzw. Peaks), geringem Hintergrundrauschen und damit vergleichbarer Qualität zu generieren.

Unter Zuhilfenahme der Steuerungs- und Auswertungssoftware des Herstellers FlexControl 2.4 (Bruker Daltonics, BRD) erfolgte zu Beginn ein automatisches „glätten“ der Spektren (Smoothing) sowie eine Basisliniensubstraktion (Baselinesubtraction). Hierbei wurde das Spektrum über den gesamten Massenbereich auf einen einheitlichen Nullwert gesetzt. Anschließend wurden die Signale mit dem Programm FlexAnalysis 2.4 (Bruker Daltonics, Bremen, BRD) berechnet (Peaklabeling) und im xml-Format (Peaklist) gespeichert. Die Detektion erfolgte im Bereich von 600 bis 4000 Da. Dabei wurden nur Massen berechnet, die mindestens ein Verhältnis von Signal/Hintergrundrauschen (s/n) von fünf aufwiesen. Für den direkten Vergleich der Referenzstämme und klinischen Isolate wurden alle Spektren auf maximal 80 Signale normiert, wobei nur die intensivsten Massen im Bereich von 900 bis 4000 Da berücksichtigt wurden. Spektren mit geringerer Massenanzahl gingen ebenfalls in die Studie ein. Zusätzlich zur bereits erfolgten externen Kalibrierung des Massenspektrometers wurden die Spektren mit FlexAnalysis 2.4 intern nachkalibriert. Dies erfolgte über Massen (Tab. 6), die vermehrt in den Spektren der Stämme detektiert wurden.

Tabelle 6: Massen zur internen Kalibrierung [Dalton]

664.17	1089.62	1160.57	1202.69	1238.59	1382.65
1391.81	1418.73	1549.78	1638.80	1641.90	1775.98
1795.88	1897.98	1994.95	2101.07	2195.35	2597.35
2905.73	2947.44				

Die Qualität des oben beschriebenen enzymatischen Abbaus der Stämme wurde rasterelektronenmikroskopisch kontrolliert. Dazu wurde sowohl eine unverdaute als auch eine verdaute Probe des Sediments aller Referenzstämmen und ausgewählte klinische Isolate (D100, D130, D150, D151, D152, D158, D320, D347, D375, D528, D529, D567, D611, D626, D627, D678, D704, D747, D961) auf je ein Deckgläschen aufgebracht, ausgestrichen, luftgetrocknet, mit einer Goldschicht von 25 – 30 nm bedampft (Sputter Coater BAL-TEC SCD 005, BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein) und im Rasterelektronenmikroskop LEO 1450 VP (Leo Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen, Deutschland) standardisiert bei verschiedenen Vergrößerungen betrachtet.

4.3.3 Analyse der Messergebnisse mit MS-Screener 1.1

Für die Verarbeitung der Massenspektren wurde das Programm MS-Screener 1.1 verwendet. Die Software ist in der Lage, verschiedene ASCII Peaklisten, wie .pkm (GRAMS), .pkt/.txt (Data Explorer), .xml (FlexAnalysis) und .dta (SEQUENT) zu importieren, und diese durch die integrierte JFreeChart Class Library graphisch darzustellen. Auf Grundlage einer Intervallmatrix können Peaklisten rekaliert, Massen gezählt, Kontaminanten entfernt, Peaklisten verglichen (Similarity Search), Signalverhältnisse und/oder die Half-Decimal-Places-Rule (HDPR) berechnet werden (Schmidt et al. 2003). Für eine Clusteranalyse kann die Intervallmatrix in Form einer tabulator-separierten Datei exportiert werden.

Entfernung von Kontaminanten: Kontaminationen wie zum Beispiel Autoproteolyseprodukte von Trypsin und tryptische Peptide von Keratin können während der Probenvorbereitung mit dem Analyt und der Matrix auf den Probenteller aufgetragen und nachher detektiert werden. Ebenso können Matrixbestandteile detektiert werden und auf diese Weise das Analyseergebnis verfälschen. Zur Elimination dieser Kontaminanten sind deren Massen in einer Referenzliste des Programms MS-Screener gespeichert. Nach einem Abgleich mit den generierten Peaklisten der Proben wurden diese Massen aus den Peaklisten entfernt.

Analyse nach der Half-Decimal-Places-Rule (HDPR): Eine Analyse nach der HDPR (Schmidt et al. 2003) gibt Hinweise auf nicht korrekt kalibrierte oder mit zu hoher Ungenauigkeit gemessene Spektren. Weiterhin erlaubt die HDPR eine

Diskriminierung von Peptidmassen gegenüber artifiziellen Massen wie zum Beispiel Matrix und Fettsäuren. Spektren, die der HDPR nicht entsprachen, wurden entweder rekali­briert oder neu vermessen.

Ermittlung der Reproduzierbarkeit der Referenzspektren: Der MS-Screener 1.1 bot die Möglichkeit, Peaklisten in das Programm einzulesen und als Datenbank zu speichern. Neu in das Programm eingelesene Peaklisten wurden bei einer vorgegebenen Toleranz von 0.25 Da mit der Datenbank verglichen (Similarity Search). Die Ergebnisse wurden hierarchisch, nach Anzahl der gemeinsam in den Peaklisten vorkommenden Massen (Hits), geordnet. Die Berechnung der Reproduzierbarkeit der drei auf 80 Peaks normierten Referenzspektren erfolgte auf der Basis des Spektrums mit dem geringsten Hintergrundrauschen.

4.3.4 Identifizierung der klinischen Isolate

Die Identifizierung der klinischen Isolate erfolgte auf der Basis eines Ähnlichkeitsvergleiches (Similarity Search) mit einer vorgegebenen Toleranz von 0.25 Da. Die Peaklisten der unbekannten klinischen Proben wurden mit den gespeicherten Peaklisten der Referenzstämme verglichen. Die Ergebnisse wurden hierarchisch nach der Anzahl übereinstimmender Massen (Hits, Position 1 bis 3) geordnet, wobei nur Ergebnisse mit einer Homologie größer 20% angezeigt wurden.

Auf Basis der im Programm MS-Screener gespeicherten Peaklisten wurden Clusteranalysen der Referenzstämme und der klinischen Isolate durchgeführt. Die Peaklisten wurden mit einer Toleranz von 0.25 Da intervallisiert und anschließend als tabulator-separierte Matrizes in die Software R (<http://www.r-project.com>) eingelesen. Mit R wurden hierarchische, agglomerative, binäre Cluster berechnet. Binär bedeutete in diesem Fall, dass nur das Vorhandensein von Massenpeaks, nicht aber deren Intensität, in die Analyse einfluss. Die Visualisierung der Cluster erfolgte in Form eines Dendograms, das als PDF-Dokument exportiert werden konnte.

5 Ergebnisse

5.1 Aufbau der Datenbank mit Referenzstämmen

Zur massenspektrometrischen Untersuchung wurden je drei getrennte Ansätze pro Referenzstamm einem Verdau unterzogen. Die mit Trypsin verdauten Peptide wurden mit Matrix (DHB) auf einen MALDI-Probenteller aufgetragen. Die anschließende Messung erfolgte mit dem Massenspektrometer Ultraflex II TOF/TOF in einem Massenbereich von 600 bis 4000 Da. Für jedes Spektrum wurde versucht mit den intensivsten detektierten Signalen in einem Intensitätsbereich von 1×10^4 bis 1×10^5 zu arbeiten. Bei der automatischen Bearbeitung der generierten Spektren mit dem Programm FlexAnalysis 2.4 erfolgte die Bestimmung der 80 intensivsten Peaks je Spektrum. In einigen Fällen war eine manuelle Bestimmung der Massen sinnvoll. Dennoch lag die Präferenz mit dem Ziel vergleichbarer Ergebnisse auf dem automatisierten Vorgehen. Zusätzlich wurden die Spektren bei Bedarf intern nachkalibriert, sowie Massen, die aus Autoproteolyseprodukten von Trypsin, tryptischen Keratinpeptiden und detektierten Matrixbestandteilen stammten, mit dem Programm MS-Screener aus den Peaklisten entfernt. Von allen 20 Referenzstämmen konnten in drei getrennten Ansätzen Spektren mit einer durchschnittlichen Anzahl von 151 detektierten Peaks generiert werden. Dabei lag der Minimalwert bei *L. buchneri* bei 24 und der Maximalwert bei *L. delbrueckii* ss *bulgaricus* bei 196 Peaks bzw. Signalen (Tab. 7). Für die jeweiligen Subspezies konnten charakteristische Spektren gewonnen werden (Abb. 8).

Die hierarchische, agglomerative, binäre Clusteranalyse der Referenzstamm-spektren wurde an dem jeweils besten Spektrum aus dem dreifachen Ansatz durchgeführt (Abb. 9). Im Ergebnis konnten drei verschiedene Gruppen innerhalb des Dendogramms identifiziert werden. Die erste Gruppe bestand hauptsächlich aus den Spezies *L. casei* und *L. paracasei*, während die zweite von *L. coryniformis* und die dritte von *L. delbrueckii* gebildet wurde. Von diesen Gruppen gelang es, die verbleibenden klar abzugrenzen.

Tabelle 7: Übersicht zu Anzahl detektierter Massen bei den Referenzstämmen

Taxon	Stamm-Nr. (DSMZ)	Anzahl an Signalen (n)
L. acidophilus	20079	186
L. alimentarius	20181	149
L. brevis	20054	196
L. buchneri	20057	24
L. casei	20011	148
L. rhamnosus	20022	117
L. rhamnosus	20178	169
L. coryniformis ss coryniformis	20001	137
L. coryniformis ss torquens	20004	161
L. delbrueckii ss bulgaricus	20080	196
L. delbrueckii ss delbrueckii	20074	44
L. delbrueckii ss lactis	20072	177
L. gasseri	20077	142
L. paracasei ss paracasei	5457	172
L. paracasei ss tolerans	20012	180
L. paracasei	20008	172
L. plantarum	2601	155
L. reuteri	20016	174
L. salivarius	20555	152
W. viridescens	20410	172

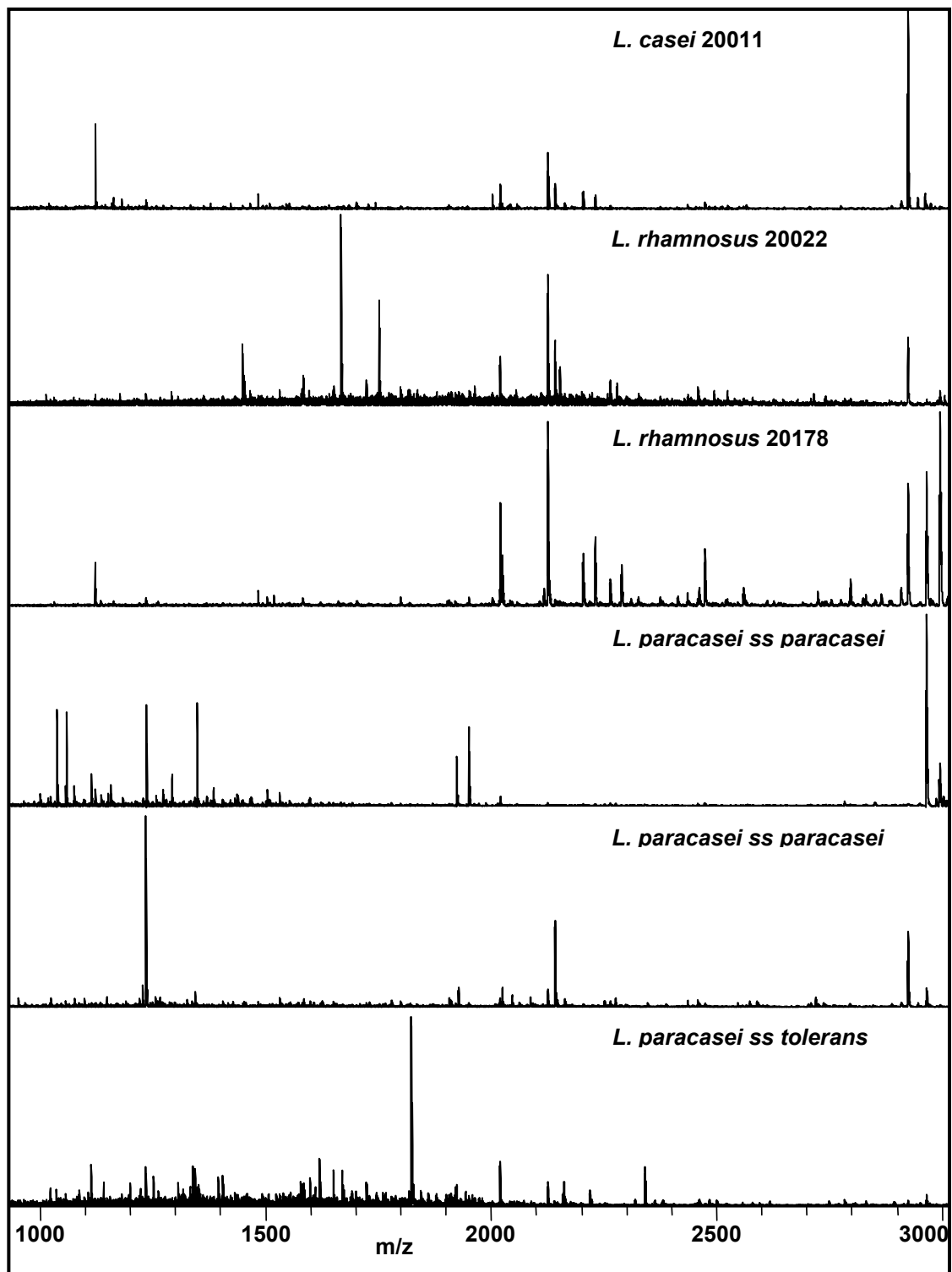


Abbildung 8: Ausschnitte aus MALDI-TOF-Massenspektren in einem Massenbereich von 900 bis 3000 m/z von 6 Referenzstämmen

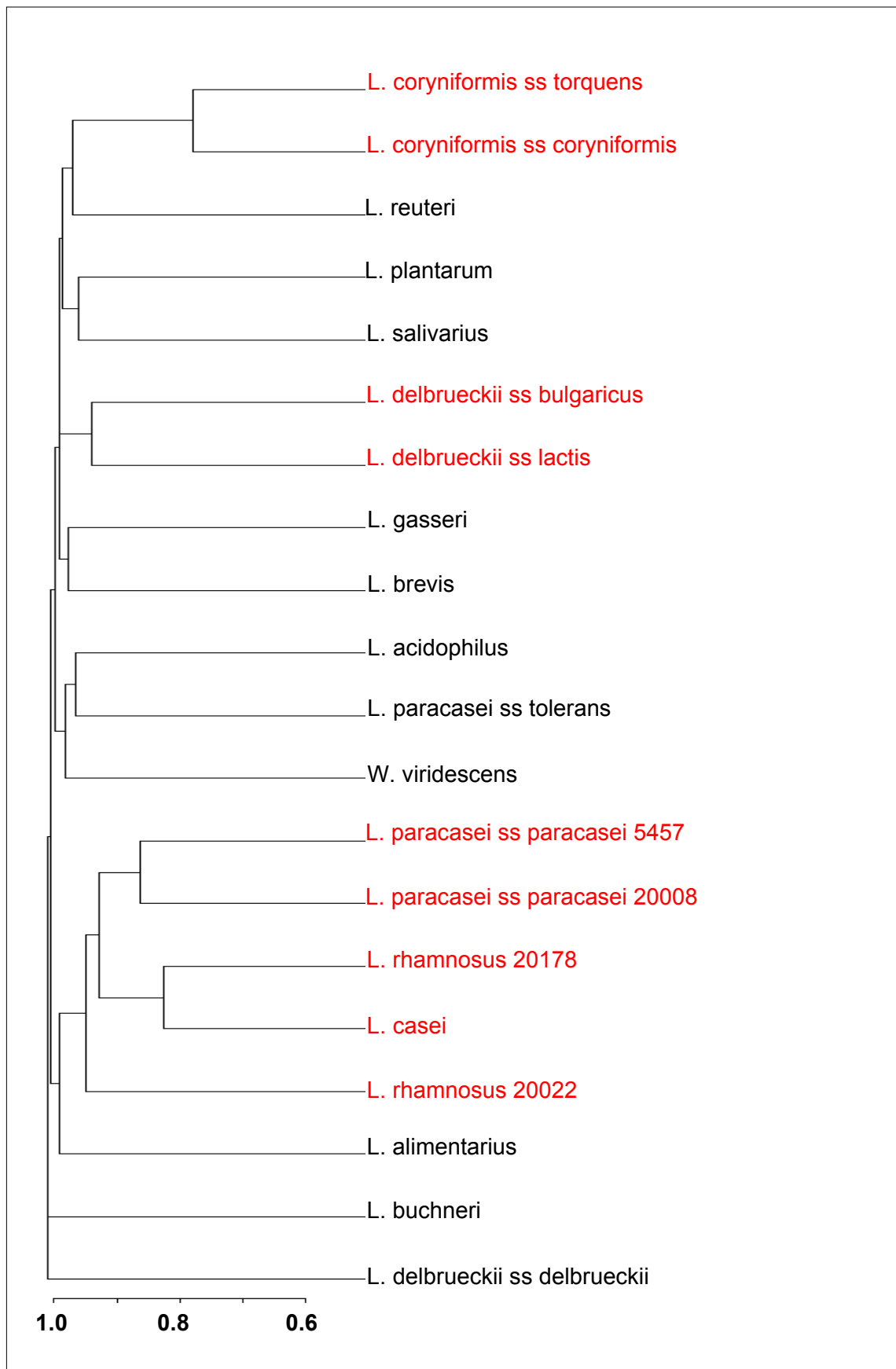


Abbildung 9: Clusterdendrogramm der Spektren von 20 Referenzstämmen mit drei Hauptgruppen um *L. casei*, *L. coryniformis* und *L. delbrueckii*

Mit Hilfe des MS-Screeners wurde die Reproduzierbarkeit der klinischen Isolate überprüft. Basis für die Untersuchung waren die generierten Peaklisten mit den jeweils 80 intensivsten Peaks in einem Massenbereich von 900 bis 4000 Da. Bei einer durchschnittlichen Reproduzierbarkeit von 74% konnte ein Maximalwert von 87% bei *L. salivarius* erreicht werden (Abb. 10). Die Spektren von *L. rhamnosus* 20178 ließen sich mit 60% am schlechtesten reproduzieren. Die Reproduzierbarkeit wurde anhand der automatisch erzeugten Peaklisten ermittelt. Eine manuelle Betrachtung der Spektren ergab jedoch eine höhere Ähnlichkeit innerhalb der Spektren eines Stammes.

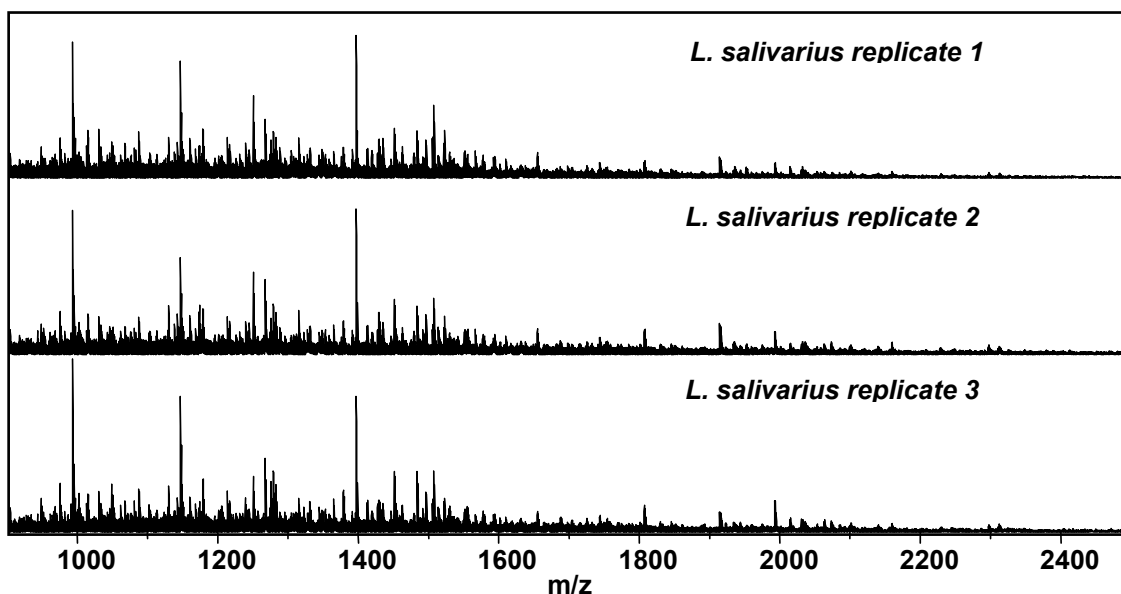


Abbildung 10: MALDI-TOF-Massenspektren von drei unabhängig präparierten Ansätzen von *L. salivarius* (DSMZ 20555) in einem Massenbereich von 600 bis 2500 Da mit einer Übereinstimmung von 87%

Generell wurde versucht, in einem Intensitätsbereich von bis zu 10^4 zu arbeiten. Hinsichtlich des Vorhandenseins oder Nicht-Vorhandenseins der detektierten Massen (binäre Betrachtung) war *L. salivarius* zu 87% reproduzierbar. Der weitere Vergleich der Spektren zeigte zudem, dass auch die Intensität, mit der gleiche Massen in den drei Spektren gemessen wurden, stark übereinstimmte (Abb. 11). Die höchste Intensitätsabweichung zwischen zwei gleichen Massen lag bei 16%.

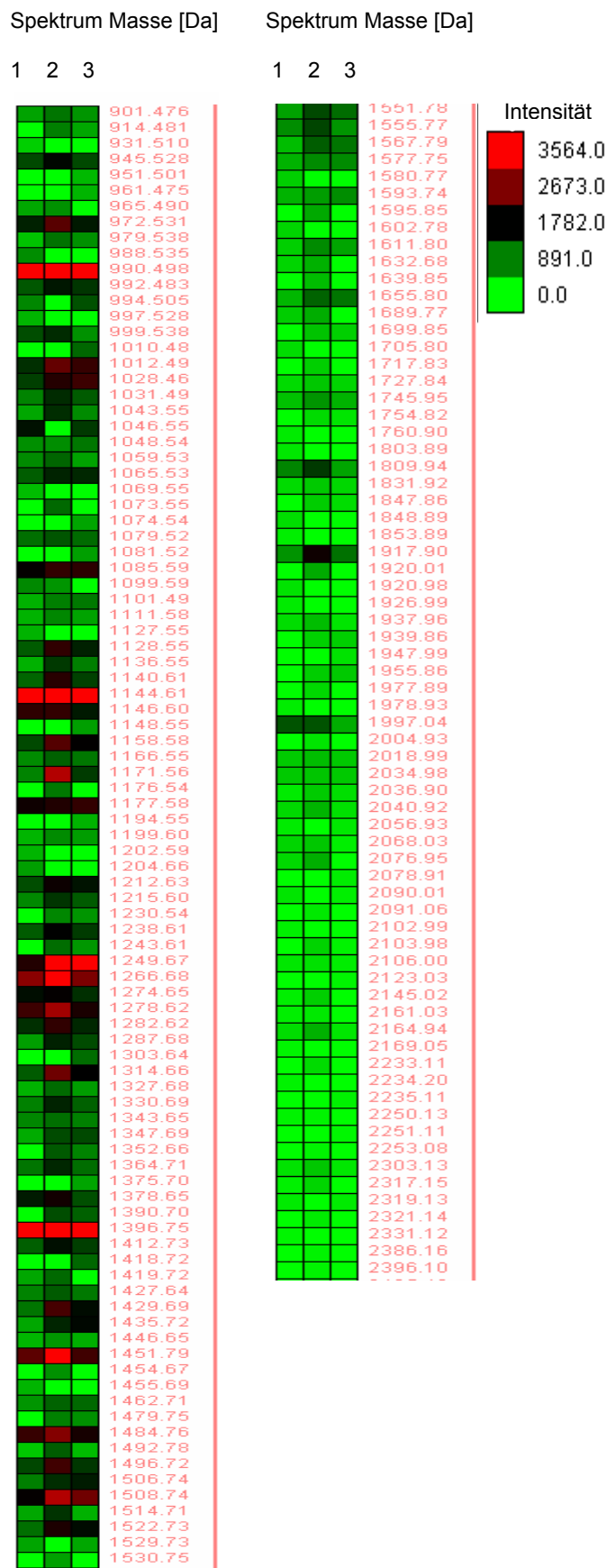


Abbildung 11: Vergleich der in drei Ansätzen von *L. salivarius* gemessenen Massen hinsichtlich ihrer Intensität

5.2 Identifikation der klinischen Isolate auf Spezies- und Subspeziesebene

Die Stämme wurden für die massenspektrometrische Untersuchung mit Trypsin verdaut. Die Qualität der enzymatischen Verdauung wurde rasterelektronenmikroskopisch kontrolliert. Die Aufnahmen zeigten, dass das gewählte methodische Vorgehen geeignet war, die Zelllyse der Referenzstämmen und klinischen Isolate herbeizuführen (Abb. 12, Anhang Abb. 1 bis 41).

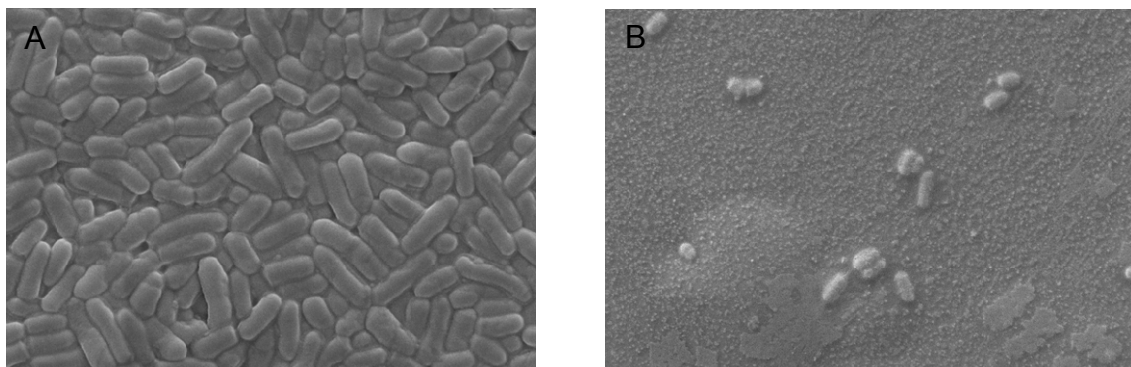


Abbildung 12: *L. paracasei* ss *paracasei* 20008 vor (A) sowie nach (B) enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 8000- (A) sowie 3000-facher (B) Vergrößerung im Rasterelektronenmikroskop

Die Entfernung von Kontaminanten aus den Peaklisten wurde mit dem MS-Screener vorgenommen. Maximal 80 der intensivsten Peaks im Bereich zwischen 900 und 4000 Da standen zum Abgleich mit der aufgebauten Datenbank auf der Basis von 20 Referenzstämmen zur Verfügung. Von allen 90 Isolaten konnten Spektren mit Massen in einem Bereich von 900 bis 4000 Da erzeugt werden. Die Identifikation der Isolate zeigte eine Übereinstimmung mit den Massen der Referenzstämmen zwischen 0 und 60% bei einem Durchschnittswert von 41%. Dabei galt eine Identifikation ab einer Übereinstimmung mit einem Referenzstamm von mindestens 20% als wahrscheinlich (Tab. 8, 9). Mit dem an zweiter Position aufgeführten Referenzstamm zeigte sich durchschnittlich eine um 12% geringere Übereinstimmung, die ungefähr einer Anzahl von 12 Massenpeaks entsprach. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der klinischen Isolate aufgeführt, bei denen der erste Identifizierungsvorschlag der Massenspektroskopie mit biochemischen Schlüsselreaktionen übereinstimmte. Es waren 43 der 81 Stämme.

Tabelle 8: Identifikation der Isolate aus erweichtem, kariösen Dentin (S) und hart kariös verändertem Dentin nach definitivem Kavitätenverschluss (H1) sowie nach einer Beobachtungszeit von 11,2 Monaten (H2)

Stamm- Identifikation Nr.	Her- kunft	Prozentuale Übereinstimmung mit der Datenbank (Referenzstämme*)		
		1. Position %	2. Position %	3. Position %
D155	L. paracasei ss paracasei	S	20008*39	20178 39
D253	L. paracasei ss paracasei	S	20008 40	20022 30
D280	L. paracasei ss paracasei	S	20008 40	20011 28
D340	L. paracasei ss paracasei	S	20008 45	20011 38
D588	L. paracasei ss paracasei	S	20008 31	20012 22
D624	L. paracasei ss paracasei	S	20008 38	20022 33
D514	L. paracasei ss paracasei	S	20008 44	20012 32
D528	L. paracasei ss paracasei	S	20008 46	20011 26
D100	L. paracasei ss tolerans	S	20012 60	20008 36
D110	L. paracasei ss tolerans	S	20012 35	20008 24
D341	L. paracasei ss tolerans	S	20012 40	20008 26
D566	L. paracasei ss tolerans	S	20012 31	20022 31
D121	L. paracasei ss tolerans	S	20012 28	20008 20
D304	L. paracasei ss tolerans	S	20012 46	20008 44
D611	L. rhamnosus	S	20022 34	20008 20
D702	L. rhamnosus	S	20022 40	20008 36
D135	L. rhamnosus	S	20022 33	20012 26
D136	L. rhamnosus	S	20022 46	20008 42
D58	L. rhamnosus	S	20022 35	20008 33
D626	L. gasseri	S	20077 34	20008 14
D156	L. gasseri	S	20077 26	20079 15
D403	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 45	20011 38
D148	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 48	20008 35
D268	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 42	20008 37
D317/	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 40	20008 35
D318	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 40	20008 35
D370	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 41	20008 34
D508	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 48	20008 35
D678	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 51	20008 35
D679	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 45	20008 24
D682	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 50	20008 44
D703	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 45	20008 40
D616	L. paracasei ss tolerans	H1	20012 39	20008 36
D130	L. rhamnosus	H1	20022 52	20008 31
D321	L. rhamnosus	H1	20022 35	20008 31
D361	L. rhamnosus	H1	20022 52	20008 28
D564	L. rhamnosus	H1	20022 34	20008 33
D18	L. rhamnosus	H1	20022 29	20008 26
D151	L. gasseri	H1	20077 29	20008 21
D944	L. paracasei ss paracasei	H2	20008 41	20011 29
D938	L. paracasei ss tolerans	H2	20012 38	20008 23
D949	L. paracasei ss tolerans	H2	20012 42	20008 34
D959	L. rhamnosus	H2	20178 38	20008 36
Mittelwert			40,35	31,05
Standardabweichung			7,33	7,24
				25,21
				6,01

* Stammmummern siehe Tabelle 3

Die Arten *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. paracasei* ss *tolerans*, *L. rhamnosus* und *L. gasseri* waren eingeschlossen (Abb. 13). Die Stämme wurden durch ihre L-Laktatbildung aus Glukose und die Säureproduktion aus ausgewählten Kohlenhydraten, insbesondere Rhamnose, bestätigt (Tab. 10).

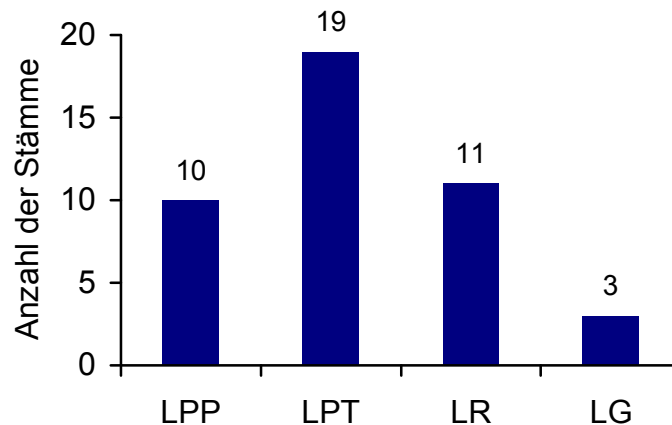


Abbildung 13: Massenspektrometrisch nach Rangfolge in erster Position identifizierte und biochemisch nach Schlüsselreaktionen als *L. paracasei* ss *paracasei* (LPP), *L. paracasei* ss *tolerans* (LPT), *L. rhamnosus* (LR) und *L. gasseri* (LG) bestätigte klinische Isolate

In Tabelle 9 sind die klinischen Isolate aufgelistet, bei denen biochemische Merkmale in Übereinstimmung mit der zweiten, dritten oder nachfolgenden Position der massenspektroskopischen Identifizierung lagen. Die Entscheidung zugunsten von *L. rhamnosus* ($n = 32$) und zuungunsten von *L. paracasei* ss *paracasei* erfolgte durch die Säurebildung aus Rhamnose, Umgekehrt wurden drei in erster Position als *L. rhamnosus* vorgeschlagene Stämme durch die fehlende Säureproduktion aus Rhamnose als *L. paracasei* ss *paracasei* bestätigt. In zwei Fällen wurde *L. paracasei* ss *paracasei* als Ergebnis zugunsten von *L. paracasei* ss *tolerans* abgelehnt; *L. paracasei* ss *tolerans* ist – wie vorliegend – in den biochemischen Reaktionen träge. Ein weiteres klinisches Isolat, das in der ersten Position als *L. delbrueckii* ss *lactis* vorgeschlagen wurde, konnte durch die Bildung von L-Milchsäure und weitere biochemischer Reaktionen als *L. alimentarius* bestätigt werden (Abb. 14).

Tabelle 9: Identifikation der Isolate aus erweichtem, kariösen Dentin (S) und hartem, kariös verändertem Dentin nach definitivem Kavitätenverschluss (H1) sowie nach einer Beobachtungszeit von 11,2 Monaten (H2)

Stamm- Identifikation Nr.		Her- kunft	Prozentuale Übereinstimmung mit der Datenbank (Referenzstämme*)		
			1. Position %	2. Position %	3. Position %
				<i>L. rhamnosus</i>	
D229	L. paracasei ss paracasei	S	20008*44	20178 38	20011 35
D650	L. paracasei ss paracasei	S	20008 41	20178 34	20011 32
D808	L. paracasei ss paracasei	S	20008 35	20178 34	20011 32
D17	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 46	20178 40	20011 39
D634	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 38	20178 34	20011 33
D895	L. paracasei ss paracasei	H2	20008 37	20178 33	20011 29
D923	L. paracasei ss paracasei	H2	20008 44	20178 39	20011 38
D279	L. paracasei ss paracasei	S	20008 41	20022 34	20178 33
D589	L. paracasei ss paracasei	S	20008 39	20022 34	20011 29
D701	L. paracasei ss paracasei	S	20008 43	20022 29	20012 27
D149	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 45	20022 41	20011 30
		Mittelwert	41,18	35,45	32,45
		Standardabweichung	3,57	3,59	3,75
				<i>L. paracasei ss tolerans</i>	
D623	L. paracasei ss paracasei	S	20008 50	20012 49	5457 34
				<i>L. paracasei ss paracasei</i>	
D497	L. rhamnosus	H1	20022 41	20008 40	20011 33
D583	L. rhamnosus	H1	20022 35	20008 25	20011 23
D941	L. rhamnosus	H2	20022 31	20008 30	20011 25
		Mittelwert	35,67	31,67	27,00
		Standardabweichung	5,03	7,64	5,29
				<i>L. alimentarius</i>	
D747	L. delbrueckii ss lactis	H1	20072 50	20181 46	20008 44
					<i>L. rhamnosus</i>
D639	L. paracasei ss paracasei	S	20008 39	20011 39	20178 29
D684	L. paracasei ss paracasei	S	20008 41	20011 36	20178 31
D807	L. paracasei ss paracasei	S	20008 41	20011 32	20178 26
D93	L. paracasei ss paracasei	S	20008 45	20011 39	20178 39
D856	L. paracasei ss paracasei	H2	20008 44	20011 31	20178 26
D989	L. paracasei ss paracasei	H2	20008 36	20011 34	20178 29
D962	L. paracasei ss paracasei	H2	20008 38	20011 34	20178 31
D633	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 35	20011 26	20022 26
		Mittelwert	39,88	33,88	29,63
		Standardabweichung	3,56	4,32	4,34
				<i>L. rhamnosus</i>	
D140	L. paracasei ss paracasei	S	20008 48	20011 36	20012 29
D599	L. paracasei ss paracasei	S	20008 44	20012 32	5457 30
D610	L. paracasei ss paracasei	S	20008 44	20012 37	5457 35
D641	L. paracasei ss paracasei	S	20008 46	20012 40	20011 39
D809	L. paracasei ss paracasei	S	20008 40	20012 35	20011 28
D810	L. paracasei ss paracasei	S	20008 41	20012 38	20011 33

Fortsetzung siehe nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 9: Identifikation der Isolate aus erweichtem, kariösen Dentin (S) und hartem, kariös verändertem Dentin nach definitivem Kavitätenverschluss (H1) sowie nach einer Beobachtungszeit von 11,2 Monaten (H2)

Stamm- Identifikation Nr.		Her- kunft	Prozentuale Übereinstimmung mit der Datenbank (Referenzstämme*)			
			1. Position %	2. Position %	3. Position %	
<i>L. rhamnosus</i>						
D131	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 40	20011 30	20012 29	
D327	L. paracasei ss paracasei	H1	5457 43	20008 41	20011 39	
D375	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 46	20012 34	5457 33	
D410	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 33	20012 28	5457 26	
D824	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 44	20012 31	20011 30	
D613	L. paracasei ss paracasei	H1	20008 46	20012 43	5457 27	
D961	nicht identifiziert	H2	-	-	-	-
Mittelwert			42,92	35,42	31,50	
Standardabweichung			4,01	4,64	4,36	
<i>L. paracasei ss tolerans</i>						
D896	L. paracasei ss paracasei	H2	20008 41	20011 34	20022 32	

* Stammnummern siehe Tabelle 3

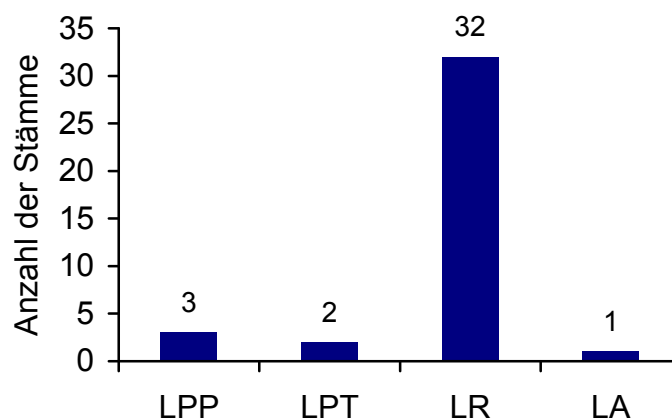


Abbildung 14: Massenspektrometrisch nach Rangfolge in zweiter, dritter oder nachfolgender Position identifizierte und biochemisch nach Schlüsselreaktionen als *L. paracasei* ss *paracasei* (LPP), *L. paracasei* ss *tolerans* (LPT), *L. rhamnosus* (LR) und *L. alimentarius* (LA) bestätigte klinische Isolate

Tabelle 10 zeigt zusammenfassend die klinischen Isolate nach ihrer Herkunft (Abb. 5) und Zuordnung zum Identifizierungsergebnis.

Tabelle 10: Identifizierte klinische Isolate von Laktobazillen (n = 90) aus kariösen Progressionsstadien von Milchmolaren mit Caries profunda

Dentinkonsistenz/Art (Isolationsnummer)

Erweichtes kariöses Dentin S

L. paracasei ss paracasei (n = 8)

D253*, D280, D528*, D624, D340, D514, D588, D155

L. paracasei ss tolerans (n = 7)

D100, D110, D121*, D304*, D341, D623, D566*

L. rhamnosus (n = 21)

D58, D93*, D135, D136, D140*, D229, D279, D589, D599, D610*, D611*, D639, D641*, D650, D684*, D701*, D702*, D807, D808, D809, D810

L. gasseri (n = 2)

D156, D626

Lactobacillus spec.: D158, D529*, D567, D627

Hart kariös verändertes Dentin H1

L. paracasei ss paracasei (n = 3)

D403, D497, D583*

L. paracasei ss tolerans (n = 11)

D148, D268*, D370, D508, D678, D679*, D703*, D317*, D318*, D682, D616*

L. rhamnosus (n = 15)

D17, D18, D130*, D131*, D149, D321, D327*, D361*, D375, D410*, D564, D613*, D633*, D634*, D824*

L. gasseri (n = 1)

D151

L. alimentarius (n = 1)

D747

Lactobacillus spec.: D150, D152, D320, D347, D704

Hart kariös verändertes Dentin H2 – nach 11,2 Monaten klinischer Beobachtung

L. paracasei ss paracasei (n = 2)

D944*, D941

L. paracasei ss tolerans (n = 3)

D896*, D938*, D949*

L. rhamnosus (n = 7)

D856, D895*, D923, D959, D96, D962, D989

	Cel	Raf	Rha	Man	Mel	Lactat
<i>L. paracasei ss parac.</i>	+	-	-	+	-	L
<i>L. paracasei ss tolerans</i>	-	-	-	-	-	L
<i>L. rhamnosus</i>	+	-	+	+	-	L
<i>L. alimentarius</i>	+	-	-	-	-	L(D)
<i>L. gasseri</i>	+	±	-	-	±	D,L

* Isolate aus zweitägiger aerober Bebrütungsserie

Säureproduktion aus: Cel= Cellobiose, Raf=Raffinose, Rha=Rhamnose, Man=Mannitol, Mel=Melibiose

5.3 Vorkommen von Laktobazillen in kariösen Progressionsstadien

In der vorliegenden Arbeit wurden 81 Laktobazillen aus kariösen Progressionsstadien von Milchmolaren bis zur Art identifiziert (Tab. 10); 9 Laktobazillenisolat konnten nicht bis zur Art bestimmt werden. Von den 81 Laktobazillen stammten 34 aus einer parallelen zweitägigen aeroben Bebrütungsserie der Dentinproben, die nicht in der gesamten Studie durchgeführt wurde, weil sich eine siebentägige Bebrütung hinsichtlich der Keimausbeute als effizienter erwies (Heinrich und Kneist 1986). Die 34 Laktobazillenstämme erhöhten aber die Stammzahl für die in Kapitel 5.2 dargestellten taxonomischen Untersuchungen (Abb. 15).

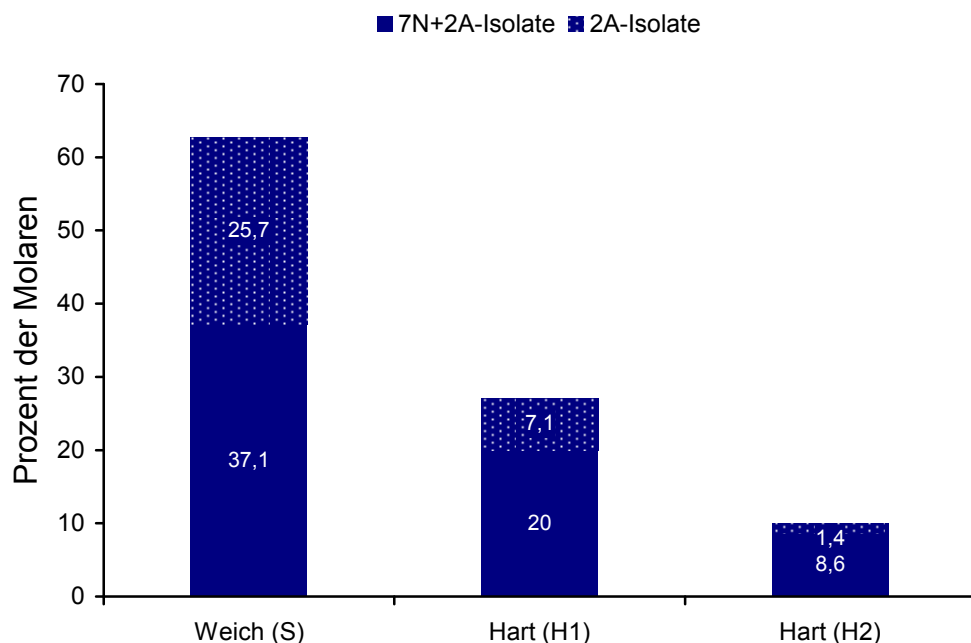


Abbildung 15: Prozentualer Anteil von Milchmolaren mit Laktobazillen im erweichten, kariösen Dentin (S, 35 Molaren) und hart, kariös verändertem Dentin (H1 und H2, 70 Molaren) (7N = isoliert nach sieben Tagen anaerober Inkubation; 2A = isoliert nach zwei Tagen aerober Inkubation)

Die nachfolgende Bewertung des Vorkommens von Laktobazillen in den kariösen Progressionsstadien der Milchmolaren bezieht sich auf die Isolate (Tab. 11) und Keimzahlen (Tab. 3) nach regelmäßig durchgeführter siebentägiger anaerober Inkubation der Dentinproben (Abb. 5).

In Abbildung 15 wird verdeutlicht, dass sich mit zunehmendem Progressionsstadium die Anzahl der Molaren mit positivem Laktobazillennachweis verringerte.

Tabelle 11: Identifizierte klinische Isolate (n = 47) von Laktobazillen (n = 90) aus kariösen Progressionsstadien von Milchmolaren mit Caries profunda nach 7-tägiger anaerober Bebrütung

Dentinkonsistenz/Art (Isolationsnummer)

Erweichtes kariöses Dentin S

***L. paracasei ss paracasei* (n = 6)**

D280, D624, D340, D514, D588, D155

***L. paracasei ss tolerans* (n = 4)**

D100, D110, D341, D623

***L. rhamnosus* (n = 13)**

D58, D135, D136, D229, D279, D589, D599, D639, D650, D807, D808, D809, D810

***L. gasseri* (n = 2)**

D156, D626

Hart kariös verändertes Dentin H1

***L. paracasei ss paracasei* (n = 2)**

D403, D497

***L. paracasei ss tolerans* (n=5)**

D148, D370, D508, D678, D682

***L. rhamnosus* (n = 6)**

D17, D18, D149, D321, D375, D564

***L. gasseri* (n = 1)**

D151

***L. alimentarius* (n = 1)**

D747

Hart kariös verändertes Dentin H2 – nach 11,2 Monaten klinischer Beobachtung

***L. paracasei ss paracasei* (n = 1)**

D941

***L. rhamnosus* (n = 6)**

D856, D923, D959, D961, D962, D989

Bei 13 von 35 Milchmolaren wurden Laktobazillen aus erweichtem, kariösen Dentin isoliert. Diese Anzahl sank auf 14 von 70 Molaren am harten Kavitätenboden vor definitivem Kavitätenverschluss und auf sechs nach 11,2 Monaten klinischer Beobachtungszeit. Im Laufe der Caries-profunda-Therapie sank der Anteil von Milchzähnen mit positivem Laktobazillennachweis somit von 37,1% über 20% auf 8,6% am Ende der klinischen Beobachtungszeit (Abb. 15).

Im erweichten Dentin (S) konnte *L. rhamnosus* in 9 (25,7%) von 35 Milchmolaren (MM) am häufigsten isoliert werden. Es folgten *L. paracasei ss paracasei* (6 MM, 17,4%), *L. paracasei ss tolerans* (4 MM, 11,4%) und *L. gasseri* (4 MM, 5,7%) (Abb. 16).

Am harten Kavitätenboden (H1) wurde *L. rhamnosus* in vier (5,7%) von 70 Molaren nachgewiesen, *L. paracasei* ss *tolerans* aus den Dentinproben von fünf (7,1%) Milchmolaren, *L. paracasei* ss *paracasei* in zwei Fällen (2,9%) und *L. gasseri* und *L. alimentarius* in je einem Fall (1,4%) (Abb. 16).

Nach 11,2-monatiger Beobachtung (H2) überlebte *L. rhamnosus* am harten Kavitätenboden von fünf Molaren (7,1%) und *L. paracasei* ss *paracasei* nur noch in einem (1,4%) (Abb. 16).

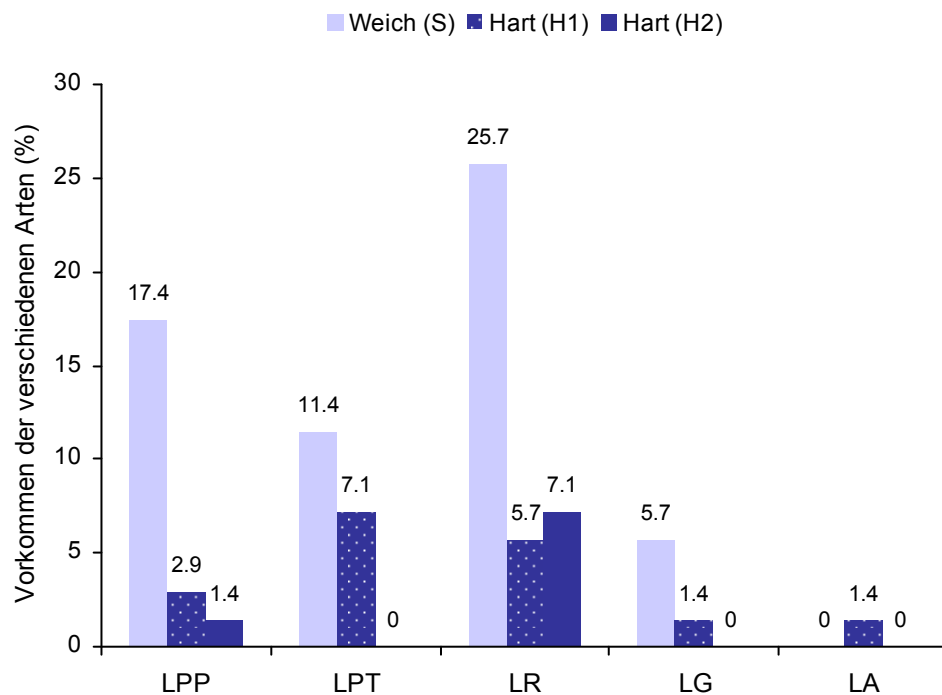


Abbildung 16: Prävalenz von *L. paracasei* ss *paracasei* (LPP), *L. paracasei* ss *tolerans* (LPT), *L. rhamnosus* (LR), *L. gasseri* (LG), und *L. alimentarius* (LA) in erweichtem, kariösem Dentin (S, 35 Molaren) und hart, kariös verändertem Dentin (H1, H2, 70 Molaren)

Die Prävalenz der Arten in der jeweiligen Gesamtkeimzahl ist in Tabelle 12 dargestellt. Im erweichten, kariösen Dentin (S) lag *L. rhamnosus* in der CFU (Tab. 3, Tab. 11) der betroffenen Molaren mit einer Prävalenz von 40,7% vor, gefolgt von *L. paracasei* ss *paracasei* mit einer Prävalenz von 38,0%, *L. paracasei* ss *tolerans* mit einer Prävalenz von 34,9% und *L. gasseri* mit 34,3%. Bei signifikant reduzierter Keimzahl am harten Kavitätenboden (Tab. 3, Tab. 12) lag die Prävalenz von *L. paracasei* ss *paracasei* bei 70,1%, die von *L. paracasei* ss *tolerans* bei 52,6% und die von *L. rhamnosus* bei 37,7%; jeweils 2, 5 und 4 Molaren waren betroffen. Die Prävalenz von *L. gasseri* und *L. alimentarius* lag in jeweils einem Molar unter 10,0%.

Tabelle 12: Anteil (%; $\bar{x} \pm SD$) der Laktobazillen an der Gesamtkeimzahl der Dentinproben aus erweichtem (S) und hart kariös verändertem Dentin (H1, H2) von 35 bzw. 70 Milchmolaren (in Klammern Anzahl der Molaren)

Spezies	Dentinkonsistenz		
	weich (S)	Hart (H1)	Hart (H2)
<i>L. paracasei ss paracasei</i>	38,0 ± 23,9 (6)	70,3 ± 5,2 (2)	50,0 (1)
<i>L. paracasei ss tolerans</i>	34,9 ± 19,3 (4)	52,6 ± 31,2 (5)	-
<i>L. rhamnosus</i>	40,7 ± 35,4 (9)	37,7 ± 21,5 (4)	60,9 ± 48,6 (5)
<i>L. gasseri</i>	34,3 ± 40,5 (2)	4,0 (1)	-
<i>L. alimentarius</i>	-	8,2 (1)	-

Nach durchschnittlich 11,2 Monaten klinischer Beobachtung lag die Prävalenz von *L. paracasei ss paracasei* in einem Molar bei 50,0% und die von *L. rhamnosus* in 5 Molaren bei 60,9% (Tab. 3, Tab. 12). Pulpawärts nahm die Artenvielfalt insgesamt ab (Tab. 13).

Tabelle 13: Gemeinsames Auftreten von Laktobazillen im kariösen Dentin von 35 (S) bzw. 70 Milchmolaren (H1, H2)

Kombinationen	Dentinkonsistenz		
	weich (S)	Hart (H1)	Hart (H2)
LR	7	3	5
LPT	2	3	0
LPP	1	2	1
LA	0	1	0
LR + LPT	2	1	0
LPP + LG	1	0	0
LPP + LPT	1	0	0
LR + LPT + LG	0	1	0
LPP + LPT + LG	1	0	0

LPP = *L. paracasei ss paracasei*, LPT = *L. paracasei ss tolerans*, LR = *L. rhamnosus*, LG = *L. gasseri*, LA = *L. alimentarius*

L. rhamnosus kam am häufigsten im erweichten kariösen Dentin vor und persistierte auch nach 11,2 Monaten im hart kariös veränderten Dentin am

häufigsten. Die nachgewiesenen Arten kamen weiterhin häufiger allein als in Kombination vor.

6 Diskussion

6.1 Zur Identifikation von Laktobazillen

Laktobazillen sind ubiquitär in der Tier- und Pflanzenwelt verbreitet.

Bis in die Mitte des letzten Jahrhunderts wurden Laktobazillen auf Tomatensaftagar angezüchtet. Hadley wies 1933 Laktobazillen im Speichel durch Kultivierung auf Tomatensaftagar nach. Gleichwohl können sich auf diesem Medium auch Hefen, Streptokokken und gramnegative Stäbchen vermehren. Mit Entwicklung des Rogosaagar (Rogosa et al. 1951) stand erstmals ein synthetisches und selektives Kulturmedium für Laktobazillen zur Verfügung. Es besteht vorwiegend aus Azetaten und verschiedenen Salzen, hat eine geringe Oberflächenspannung und einen niedrigen pH-Wert von 5,4. Als Wachstumsstimulator wird Tween 80 zugesetzt (Abb. 17).

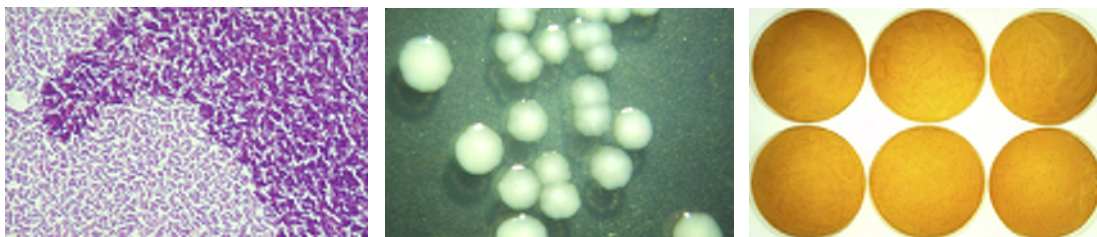


Abbildung 17: Laktobazillen im Grampräparat, Ausschnitt von Kolonien auf Rogosaagar aus einer Verdünnungsreihe des Untersuchungsgutes in Petrischalen

Das selektive Wachstum von Laktobazillen auf Rogosaagar wird durch den niedrigen pH-Wert, der andere Mikroorganismen in ihrem Wachstum unterdrückt, erreicht. Die Selektivität ist dennoch eingeschränkt, da auf dem Nährmedium ebenfalls Hefen und einige Streptokokken anwachsen können (Kandler und Weiss 1986). Letztere sind jedoch makroskopisch von Laktobazillenkolonien leicht abgrenzbar.

Um aus zahnmedizinischer Sicht die Bestimmung der Laktobazillenanzahl in der oralen Flora vornehmen zu können, wurden mit Beginn der 50er Jahre verschiedene mikrobiologische Tests bzw. Kultursysteme entwickelt. Snyder (1951) schlug zur Bestimmung der relativen Anzahl von Laktobazillen im Speichel einen einfachen Test in Bouillon vor. Rogosa et al. (1953) gelang die Weiterentwicklung der Methode von Snyder (1951), nach der Laktobazillen semiquantitativ nach Einteilung in Keimzahlklassen auf Rogosaagar bestimmt

werden. Heute stehen der Dentocult® LB (Orion Diagnostica, Espoo, Finnland), Cario Check® LB (Hain Diagnostica, Deutschland) und der CRT®bacteria (Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) zum Nachweis von Laktobazillen in der zahnärztlichen Praxis zur Verfügung (Larmas 1975, 1985). Allen Kultursystemen liegt die semiquantitative Einteilung in Keimzahlklassen auf Rogosaagar zugrunde.

In zahnmedizinischen Studien wurde gewöhnlich zum Vorkommen von Laktobazillen in Speichel, Plaque und kariösem Dentin keine weitere Artbestimmung vorgenommen. Heute werden dazu sowohl phänotypische Eigenschaften als auch chemotaxonomische und phylogenetische Merkmale herangezogen. Phänotypische Eigenschaften schließen die Morphologie ein. Dies können Farbe, Form und Beschaffenheit der Kolonie, Gestalt, Form und Größe der Zellen, aber auch ihre biochemischen und physiologischen Leistungen, sowie ihr Verhalten gegenüber Sauerstoff, Temperatur und pH-Wert sein (Drews 1983).

Loesche und Syed (1973) testeten das Vorhandensein von Katalase, die Nitratreduktion, Gelatineverflüssigung und Indolproduktion, sowie fakultatives aerobes Wachstum von 334 Isolaten aus kariösem Dentin und 522 Isolaten aus der jeweils bedeckenden Plaque. Die Autoren konnten auf diese Weise Laktobazillen zwar bestimmen, aber keine definitive Aussage hinsichtlich der jeweiligen Arten und Subspezies treffen. Loesche und Syed (1973) vermuteten jedoch *L. casei* als dominierenden Keim im kariösen Dentin.

Edwardsson (1974) versuchte mit biochemischen und physiologischen Tests, gaschromatographisch und mit Geldiffusionsanalyse 220 repräsentative klinische Isolate aus kariösem Dentin zu identifizieren. Die Bestätigung verschiedener Stoffwechselleistungen und des Vorhandenseins von Enzymen gelingt bei biochemischen und physiologischen Testverfahren über den Farbumschlag eines im Reagenz enthaltenen Indikators. Edwardsson (1974) konnte 84 der 220 Isolate als Laktobazillen bestimmen. Davon ordnete der Autor 40 der Gruppe *L. casei* ss *casei* und *L. casei* ss *ramnosus*, 20 der Gruppe *L. acidophilus* und *L. salivarius* ss *salivarius* und weitere 21 der Gruppe *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis* und *L. buchneri* zu. 12 Isolate konnten nicht weiter hinsichtlich ihrer Art differenziert werden.

In darauffolgenden Versuchen zur Differenzierung von Laktobazillen mit zahnmedizinischer Bedeutung wurden die biochemischen Testverfahren immer weiter entwickelt.

Unter strikt anaerobem Vorgehen isolierte Hoshino (1985) obligat anaerobe Mikroorganismen aus oberflächlichem und tiefem kariösen Dentin von vier extrahierten Weisheitszähnen. Die Proben sowie Kontrollen aus intaktem Dentin wurden auf Hirn-Herz-Agar anaerob angezüchtet und anschließend, basierend auf dem „Anaerobe Laboratory Manual“ (Holdeman et al. 1977), mit biochemischen und physiologischen Testverfahren identifiziert. Von 275 repräsentativen Isolaten erwiesen sich 26 als Laktobazillen. Diese konnten als *L. minutus* (9), *L. plantarum* (8), *L. cateniforme* (3), *L. crispatus* (3), sowie als *L. brevis* (1) und *L. cellobiosus* (1) identifiziert werden. Ein Laktobazillenisolat wurde nicht weiter hinsichtlich der Art bestimmt.

Botha et al. (1998) verwendeten mit der „Bunten Reihe“ ein klassisches physiologisches und biochemisches Testverfahren. Dieses beinhaltet in der „kleinen Bunten Reihe“ traditionell den Nachweis von H₂S-Bildung, Urease, Ornithindecaboxylase, der Fähigkeit Citrat und verschiedene Kohlenhydrate zu verstoffwechseln, Indol zu produzieren, sowie den Nachweis der Beweglichkeit der Mikroorganismen. Botha et al. (1998) wiesen so *L. paracasei*, *L. rhamnosus* und *L. murinus* als dominierende Arten im kariösen Dentin von Milchzähnen und *L. rhamnosus* und *L. paracasei* als dominierende Arten im Speichel kariesfreier Kinder nach. Des Weiteren identifizierten letztere Autoren *L. fermentum* als vorherrschenden heterofermentativen Keim sowohl im kariösen Dentin als auch im Speichel der gesunden Kinder.

Um die subjektiven Schwierigkeiten beim Ablesen des Farbumschlages biochemischer und physiologischer Testverfahren wie der „Bunten Reihe“ zu umgehen, wurde der API 50 CH (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) als kompakter Test zur Identifikation von Laktobazillen entwickelt. Das System beruht weitestgehend auf der „Bunten Reihe“. Zusätzlich wird vom Hersteller eine Referenzdatenbank zur Objektivierung beim Abgleich der Testergebnisse zur Verfügung gestellt. Boyd et al. (2005) konnten in einer Studie mit sieben Referenzstämmen (*L. crispatus*, ATCC 33197 und ATCC 202225, *L. jensenii* ATCC 25258, *L. gasseri* ATCC 9857 und ATCC 4963, *L. iners* CCUG 28746, and *L. vaginalis* ATCC 49540) der American Type Culture Collection

(Manassas, USA) und entsprechenden 90 Isolaten aus der weiblichen Vaginalschleimhaut zeigen, dass sich der API 50 CH zur Identifikation nicht sicher eignete. Kein Referenzstamm konnte auf der Speziesebene bestätigt werden. Die Hälfte der Patientenisolate, die *L. gasseri* und *L. jensenii* repräsentierten, wurden fälschlicherweise als *L. acidophilus* bestimmt. Die Ergebnisse legen nahe, dass physiologische und biochemische Testverfahren, wie die „Bunte Reihe“ einschließlich des API 50 CH Systems, zur Identifikation oraler Laktobazillen nur bedingt geeignet sind. Ergebnisse, die eine Identifikation auf Spezies und Subspeziesebene beinhalten, müssen deshalb besonders kritisch gesehen werden.

Basierend auf dieser Erkenntnis und der technologischen Weiterentwicklung molekularer Analyseverfahren, wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) als Methode zur Differenzierung von Mikroorganismen entwickelt. Dabei werden mit der PCR Abschnitte der 16S Untereinheit der ribosomalen RNA vervielfältigt. Einige Fragmente der 16S Untereinheit stellen dabei einen artspezifischen, konservierten Abschnitt der rRNA dar, so dass auf ihrer Basis Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Mikroorganismen bestimmt und weiterhin Mikroorganismen nach phylogenetischen Kriterien getrennt werden können. Song et al. (2000) empfahlen die multiplex PCR als einfache Methode zur Identifikation von intestinalen Laktobazillen. Ein Jahr später gelangen Gevers et al. (2001) die Identifikation von Laktobazillen bis zur Subspeziesebene bei Isolaten aus Lebensmitteln. Byun et al. (2004) untersuchten Laktobazillen aus kariösem Dentin mit der PCR. Sie verwandten spezies-spezifische Primer und vervielfältigten circa 400 Basenpaare. Grundsätzlich war die Differenzierung von Laktobazillen erfolgreich. Eine Unterscheidung der zahnmedizinisch besonders relevanten Arten *L. casei*, *L. rhamnosus* und *L. paracasei* war jedoch nicht möglich. Rupf et al. (1999) konnten mit spezies-spezifischen PCR-Techniken die beiden Mutans-Streptokokken *S. mutans* und *S. sobrinus* sowohl phänotypisch als auch genotypisch voneinander abgrenzen.

6.2 Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

Seit der Einführung der matrixunterstützten Laserdesorption/Ionisation (MALDI, matrix assisted laser desorption/ionization) zwischen 1985 und 1988 (Karas et al. 1985, Karas et al. 1987, Karas und Hillenkamp 1988) hat die MALDI gemeinsam mit der Elektrospray-Ionisation die moderne Massenspektrometrie revolutioniert. Die matrixunterstützte Laserdesorption erlaubt eine schonende Desorption und Ionisation nichtflüchtiger und thermisch labiler Biomoleküle. Aufgrund der anwendungsorientierten Forschung weitet sich die matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisation auf viele Fachgebiete der Analytik aus. Heute werden mit dieser Methode im Wesentlichen Biomoleküle wie Peptide, Proteine, Kohlenhydrate und Oligonukleotide, aber auch synthetische Polymere untersucht. Der Vorteil der Flugzeitmassenspektrometrie in der Analytik liegt in der hohen Sensitivität, dem großen zugänglichen Massenbereich und den relativ geringen Kosten. Üblicherweise wird bei der Massenspektrometrie zwischen Ionenerzeugung, Massenseparation und Nachweis der Ionen unterschieden.

MALDI-Ionenquelle: Auf einen Probenhalter, der in der Regel eine Metalloberfläche aus Stahl, Titan oder Gold hat, wird die Mischung aus Matrix und Analyt präpariert (Abb. 7). Das Gemisch kristallisiert und wird anschließend mit einem Laserimpuls für wenige Nanosekunden bestrahlt. Die Energie des Lasers führt zur explosionsartigen Herauslösung der Matrix und des Analyts aus der Kristalloberfläche und zu ihrer Ionisierung. Die entstandenen Ionen werden anschließend aus der MALDI-Ionenquelle in das Hochvakuum des Massenanalysators überführt und dort nachgewiesen.

Flugzeitmassenspektrometrie und Ionennachweis: Bei der Flugzeitmassenspektrometrie werden die innerhalb der Ionenquelle erzeugten Ionen im Massenanalysator nach ihrem Verhältnis m/z von Masse m [kg] zu Ladungszahl z aufgetrennt. Die Ionen gelangen nach ihrer Beschleunigung in die feldfreie Driftstrecke und werden nach einer Flugzeit [s] am Detektor nachgewiesen (Abb. 18). Hierzu dienen typischerweise Multiplier-Detektoren, wobei heute im wesentlichen Multikanalplatten oder deren Hybriddetektoren eingesetzt werden. Ionen gleichen Verhältnisses aus Masse zu Ladung werden mit identischen Flugzeiten nachgewiesen. Die Messung der Flugzeit beginnt mit dem Zeitpunkt des Laserimpulses. Nach Eichung des Massenspektrometers mit bekannten

Analytionen kann über die Flugzeit auf die Masse der unbekannten Probe zurückgeschlossen werden. Moderne Flugzeitmassenspektrometer arbeiten im Reflektormodus (Abb. 18), der die Möglichkeit bietet, die Auflösung in der Flugzeitmassenspektrometrie zu verbessern (Alikhanov 1954 Vestal et al. 1995, Kaufmann et al. 1996, Russell et al. 1997).

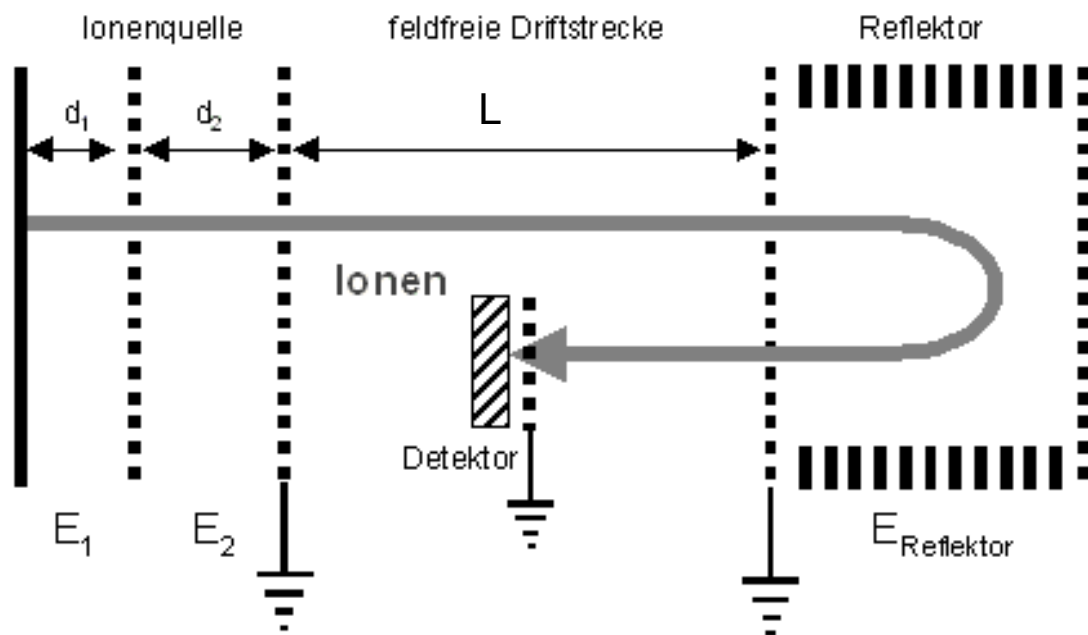


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Flugzeitmassenspektrometrie im Reflektormodus (L entspricht der Länge der feldfreien Driftstrecke, E_1 und E_2 und entsprechen den Feldstärken in der Ionenquelle mit den Abständen d_1 und d_2 , $E_{\text{Reflektor}}$ ist die Feldstärke des Reflektors)

6.2.1 Einsatz von MALDI-TOF-MS zur Identifizierung von Mikroorganismen

Mit der Entwicklung von MALDI-TOF-MS durch Karas et al. (1985) steht nun ein Verfahren zur Verfügung, das mit seiner schonenden Ionisierung die Analyse thermisch labiler Biomoleküle in kurzer Zeit, bei dennoch hoher Genauigkeit, erlaubt. Somit können verschiedenste Moleküle aus Mikroorganismen wie Proteine, Peptide, Nukleinsäuren, Fette, Phospholipide, Lipopolysaccharide und Oligosaccharide massenspektrometrisch untersucht und zur Identifikation der Mikroorganismen herangezogen werden (Claydon et al. 1996, Erhard et al. 1997, Fenselau und Demirev 2001). Seit 1975 wird die Massenspektrometrie als direkte Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen genutzt (Anhalt und Fenselau 1975). Anhalt und Fenselau (1975) analysierten damals charakteristische bakterielle Phospholipide und Ubichinone.

Zur Identifikation von Mikroorganismen können mit MALDI-TOF-MS auch massenspektrometrische Datenbanken bestehend aus den Massenspektren bekannter Keime aufgebaut werden. Gängiger Weise entstammen die Referenzkeime für die Datenbanken allgemein zugänglichen Sammlungen wie der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, BRD), der National Collection of Type Cultures (NCTC, London, England) oder der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). Mittels verschiedener Softwareprogramme können nun Spektren unbekannter Proben mit der aufgebauten massenspektrometrischen Datenbank abgeglichen und auf diesem Weg identifiziert werden. Bright et al. (2002) konnten so eine funktionierende Datenbank, bestehend aus 35 Bakterienstämmen, aufbauen. Jarman et al. (2000) testeten das Verfahren erfolgreich an *Bacillus atrophaeus* ATCC 49337, *Bacillus cereus* ATCC 14579^T, *Escherichia coli* ATCC 33694, *Pantoea agglomerans* ATCC 33243, and *Pseudomonas putida* F1. Zuvor hatten Arnold und Reily (1998) die Funktionalität an 25 Stämmen von *Escherichia coli* bewiesen. Rupf et al. (2005) gelang mit MALDI-TOF-MS an intakten Zellen (ICM) die Differenzierung von Mutans-Streptokokken aus Speichel von Kindern bis zur Subspeziesebene.

6.2.2 Einsatz von MALDI-TOF-MS zur Identifizierung oraler Laktobazillen

In der vorliegenden Untersuchung wurde ein ULTRAFLEX II (Bruker Daltonics, Bremen, BRD) im Reflektormodus zum Aufbau einer massenspektrometrischen Datenbank verwendet. Diese bestand aus Massenspektren mit Trypsin verdauter Referenzstämmen der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, BRD). Auf Basis dieser Datenbank gelang im Anschluss die Identifizierung von 81 klinischen Isolaten aus kariösem Dentin als *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. paracasei* ss *tolerans*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* und *L. alimentarius* (Tab. 8, Tab. 9). Bei 43 Isolaten stimmte der Identifizierungsvorschlag der Massenspektroskopie in erster Position mit biochemischen Schlüsselreaktionen überein. Bei 38 klinischen Isolaten gaben die biochemischen Reaktionen den Ausschlag für den an zweiter (16 Isolate), dritter (8 Isolate) oder nachfolgender Position (14 Isolate) genannten massenspektrometrischen Identifizierungsvorschlag. In 32 Fällen führte allein der positive Nachweis der Säurebildung aus Rhamnose zur Bestätigung von

Isolaten als *L. rhamnosus*; ohne Abgleich mit biochemischen Merkmalen wären massenspektroskopisch die Isolate als *L. paracasei* ss *paracasei* klassifiziert worden. Eine negative Rhamnosereaktion führte bei drei klinischen Isolaten zur Identifizierung als *L. paracasei* ss *paracasei*, zwei Isolate wurden nach biochemischen Reaktionen als *L. paracasei* ss *tolerans* und nicht als *L. paracasei* ss *paracasei* bestätigt und ein Isolat als *L. alimentarius* und nicht als *L. delbrueckii* ss *lactis*. In den Tabellen 8 und 9 sind neben den Identifizierungsvorschlägen auch die Mittelwerte und Standardabweichungen für die prozentuale Übereinstimmung der Spektren der klinischen Proben mit den Referenzspektren der Datenbank angegeben. Dabei ist an der Standardabweichung zu erkennen, dass sich die Identifizierungsvorschläge der ersten drei Positionen überlappen können bzw. eng zusammen liegen. Der Einsatz von MALDI-TOF-MS zur Identifizierung oraler Laktobazillen ersetzt damit biochemische und physiologische Testverfahren nicht vollständig; es werden Vorschläge zur Identifizierung unterbreitet. Infolgedessen wird aber im Vergleich zum früheren Vorgehen die Anzahl notwendiger biochemischer Tests, um eine Identifizierung klinischer Isolate bis zur Art objektiv vornehmen zu können, stark reduziert. So bestätigt beispielsweise die Säurebildung aus Rhamnose allein die massenspektroskopische Identifizierungsempfehlung zwischen *L. paracasei* ss *paracasei* und *L. rhamnosus* zugunsten von *L. rhamnosus*. Weitere biochemische und physiologische Test, die in der Vergangenheit verwendet wurden, sind nicht mehr notwendig (Edwardsson 1974, Botha et al. 1998). Physiologische und biochemische Testverfahren allein zeichnen sich darüber hinaus durch eine subjektive Ungenauigkeit aus (Boyd et al. 2005).

Die PCR wurde ebenfalls in oral-mikrobiologischen Studien zur Identifikation von Mikroorganismen – darunter auch Laktobazillen – genutzt. Chhour et al. (2005) konnten im kariösen Dentin zehn extrahierter bleibender Zähne 75 verschiedene Bakterienarten mit durchschnittlich 31 Arten pro Zahn nachweisen. 50% der beobachteten Keime erwiesen sich dabei als Laktobazillen. Die weitere Differenzierung der Laktobazillen mit der PCR zeigte, dass in der kariösen Läsion neben *L. casei/rhamnosus* und *L. panis/reuteri* noch *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. delbrueckii*, *L. ultunensus*, *L. crispatus*, *L. salivarius* und *L. nagelii* vorkamen. Eine Unterscheidung zwischen *L. casei*

und *L. rhamnosus* sowie *L. panis* und *reuteri* war aber letzteren Autoren nicht möglich. Aas et al (2008) konnten in Plaqueproben 39 kariesfreier Patienten und in Plaque- sowie Dentinproben von 51 an Karies erkrankter Patienten 197 verschiedene Bakterienarten nachweisen. Veillonellen, Laktobazillen, Bifidobakterien und Propionibakterien, Mutans- sowie Nicht-Mutans-Streptokokken, Aktinomyzeten und *Atopobium* dominierten den Kariesprozess. Byun et al. (2004) beschrieben mit speziesspezifischen und unspezifischen PCR-Techniken die Flora kariösen Dentins von 65 extrahierten bleibenden Molaren. *L. casei*, *L. paracasei* und *L. rhamnosus* wurden in eine *L. casei*-Gruppe zusammengefasst. Diese Gruppe kam in 68% der Molaren vor, gefolgt von *L. salivarius* (60%), *L. gasseri* (54%), *L. ultunensis* (52%), *L. crispatus* (45%) und *L. fermentum* (22%). *L. delbrueckii* und *L. gallinarum* wurden nur mit geringer Prävalenz erfasst. In keiner der genannten Untersuchungen von Byun et al. (2004), Chhour et al. (2005) sowie Aas et al. (2008) wurden die gewonnen klinischen Proben auf Nährmedien angezüchtet. Dies schließt zwangsläufig eine Bestätigung der Identifizierungen der PCR mit biochemischen und physiologischen Testverfahren aus. Des Weiteren wird mit der PCR RNA nachgewiesen. Dabei kann jedoch nur die Aussage getroffen werden, dass im Untersuchungsgut RNA bestimmter Bakterien nachweisbar war, die Lebensfähigkeit der Organismen kann nicht beantwortet werden. Wolffs et al. (2005) konnten in einer Untersuchung über quantitative PCR-Techniken belegen, dass im besonderen die Real Time-PCR die Gefahr falsch positiver Ergebnisse birgt, da mit ihr im hohen Maße auch DNA toter Zellen nachgewiesen wird. Die Ergebnisse der vorgenannten Autoren (Byun et al. 2004, Chhour et al. 2005, Aas et al. 2008) können nunmehr aber mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung vergleichend betrachtet werden. Nach kultureller Anzucht kamen Laktobazillen im kariösen Dentin mit hoher Prävalenz vor. Unter Ihnen dominieren vor allem *L. rhamnosus* und *L. paracasei* ss *paracasei*. Die Differenzierung der beiden Arten verlangt zum heutigen Wissensstand in Verbindung mit neueren Analyseverfahren (MALDI-TOF-MS, PCR) die Bestätigung biochemischer Schlüsselreaktionen wie der Säureproduktion aus Rhamnose.

Die in der vorliegenden Untersuchung verwendete Datenbank bestand aus Massenspektren von 20 Referenzstämmen der DSMZ. In Abb. 9 wird gezeigt,

dass enge Verwandtschaftsbeziehungen zwischen *L. paracasei* ss *paracasei* und *L. rhamnosus* vorliegen. In Tabelle 13 ist die Herkunft der verwendeten Referenzstämme der DSMZ dargestellt. Zwei Stämme (DSMZ 20079, 20016, 11741) haben humanen Ursprung; ein Stamm wurde aus Speichel isoliert. Die übrigen Referenzstämme stammten nicht aus der menschlichen Mundhöhle und damit auch nicht aus kariösem Dentin.

Tabelle 13: Herkunft der Referenzstämme

Taxon	DSMZ-Nr.	ATCC-Nr.	Herkunft
<i>L. acidophilus</i>	20079	4356	Mensch
<i>L. alimentarius</i>	20181	29647	Marinierter Fisch
<i>L. brevis</i>	20054	14869	Fäzes
<i>L. buchneri</i>	20057	4005	Tomatenmark
<i>L. casei</i>	20011	393	Käse
<i>L. rhamnosus</i>	20022	7469	-
<i>L. rhamnosus</i>	20178	15820	Getreide
<i>L. coryniformis</i> ss <i>coryniformis</i>	20001	25602	Silage
<i>L. coryniformis</i> ss <i>torquens</i>	20004	25600	Luft aus Kuhstall
<i>L. delbruckii</i> ss <i>bulgaricus</i>	20080	-	Joghurt
<i>L. delbruckii</i> ss <i>delbruckii</i>	20074	9649	Getreidemaische
<i>L. delbruckii</i> ss <i>lactis</i>	20072	12315	Emmentaler
<i>L. gasseri</i>	20077	19992	Menschliche Fäzes
<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>	20008	25598	Melkmaschine
<i>L. paracasei</i> ss <i>paracasei</i>	5457	-	-
<i>L. paracasei</i> ss <i>tolerans</i>	20012	-	Pasteurisierte Milch
<i>L. plantarum</i>	2601	10241	Eingelegter Kohl
<i>L. reuteri</i>	20016	23272	menschlicher Darm
<i>L. salivarius</i>	20555	11741	Speichel
<i>W. viridescens</i> (vormals <i>L. viridescens</i>)	20410	12706	Gepökeltes Fleisch

DSMZ = Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
 ATCC = American Type Culture Collection

Die Mundhöhle und besonders die kariöse Kavität stellen eine ökologische Nische dar (Gibbons und Armstrong 1964), die Einfluss auf Stoffwechselleistungen der kolonisierenden Bakterien nimmt. Die Qualität der verwendeten massenspektrometrischen Datenbank ist somit wegen der Herkunft der Stämme eingeschränkt. Folgerichtig mussten bei der durchgeführten Identifizierung klinischer Isolate aus kariösem Dentin Identifizierungsverschlüsse der massenspektrometrischen Untersuchungen um ausgewählte biochemische Schlüsselreaktion, insbesondere die Rhamnosereaktion, ergänzt werden.

Die Aufnahme der Massenspektren der nunmehr identifizierten klinischen Isolate aus kariösem Dentin in die massenspektrometrische Datenbank dürfte diese optimieren, um nachfolgend Laktobazillen aus der menschlichen Mundhöhle zweifelsfrei zu identifizieren. Zugleich dürfte die Anzahl notwendiger, subjektiv abzulesender biochemischer Reaktionen zur Identifizierung von Laktobazillen weiter eingeschränkt werden können.

6.3 Laktobazillen im kariösen Dentin

In früheren Studien zur Invasionsfront der Dentinkaries konnten bislang Laktobazillen nicht ausreichend sicher hinsichtlich ihrer Art identifiziert werden. Loesche und Syed (1973) vermuteten bei streng anaeroben Vorgehen *L. casei* als dominierenden Keim am harten kariös veränderten Dentin. Zumeist biochemische und physiologische Testverfahren wurden zur Identifizierung herangezogen. Wie aber später an Hand des API 50 CH (Boyd et al. 2005) gezeigt wurde, sind diese Verfahren bei Laktobazillen eher ungenau und daher kritisch zu bewerten. Edwardsson (1974) konnte Laktobazillen aus 22 von 46 extrahierten Zähnen isolieren. Das gewählte methodische Vorgehen stellte dabei sicher, dass tatsächlich die Mikroflora der Invasionsfront der Dentinkaries untersucht wurde. Als dominierende Arten wurden *L. casei* ss *casei* und *L. casei* ss *rhamnosus* bestimmt. Weiterhin konnte letzterer Autor noch die Arten *L. acidophilus*, *L. salivarius* ss *salivarius*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis* und *L. buchneri* isolieren. Hoshino (1985) untersuchte zwar Proben aus unterschiedlichen Progressionsstadien der Karies, konnte aber letztlich die isolierten Mikroorganismen nicht in Relation zu den jeweiligen Progressionsstadien der Karies bringen. Zudem umfasste das

Untersuchungsgut nur vier extrahierte Zähne. *L. minutus*, *L. plantarum*, *L. cateniforme*, *L. crispatus*, *L. brevis* und *L. cellobiosus* wurden bei strikt anaerober Methodik am häufigsten isoliert. In der jüngeren Vergangenheit bestimmten Botha et al. (1998) *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. murinus* und *L. fermentum* als dominierende Keime im kariösen Dentin. Bjørndal und Larsen (2000) untersuchten die mikrobiologischen Veränderungen im kariösen Dentin an neun permanenten Molaren bei schrittweiser Caries-profunda-Therapie. Die Autoren nutzten selektive und nicht selektive Nährmedien zur Anzucht der Mikroorganismen und identifizierten Laktobazillen mit physiologischen und biochemischen Testverfahren in Übereinstimmung zu Edwardsson (1974), Loesche und Syed (1973), Hoshino (1985) und Botha et al. (1998). Im weichen Dentin wurde am häufigsten *L. casei* ss *rhamnosus* gefolgt von *L. gasseri* isoliert. Weniger häufig wurden *L. acidophilus*, *L. plantarum* und *L. casei* ss *casei* beobachtet. Nach teilweiser Kariesexkavation und sechsmonatiger Einwirkung von Ca(OH)_2 dominierten weiterhin *L. casei* ss *rhamnosus* und *L. plantarum* im gering erweichten Dentin. Allerdings wurden Laktobazillen, die zuvor mit 50% der Gesamtkeimzahl das weiche kariöse Dentin beherrschten, am Kavitätenboden signifikant weniger isoliert. An ihre Stelle traten neben Streptokokken vor allem Aktinomyzeten.

In der vorliegenden Arbeit konnten *L. rhamnosus*, *L. paracasei* ss *tolerans*, *L. paracasei* ss *paracasei* und *L. gasseri* aus erweichten kariösen Dentin von 35 Milchmolaren isoliert werden (Tab. 11). *L. rhamnosus* kam dabei in neun von 35 Milchmolaren am häufigsten vor. Am hart kariös veränderten Kavitätenboden überlebte *L. rhamnosus* in fünf Molaren in einer Beobachtungszeit von 11,2 Monate nach Kariesexkavation und definitivem Kavitätenverschluss. Dabei lag sein durchschnittlicher Anteil an der CFU bei 60,9%. Allein *L. paracasei* ss *tolerans* konnte am harten Kavitätenboden in einem weiteren Molar mit einer Prävalenz in der Gesamtkeimzahl von 50,0% nachgewiesen werden. Die vorliegenden Ergebnisse stehen bei allen taxonomischen Veränderungen innerhalb der Laktobazillen in gewisser Übereinstimmung zu den früheren Studien um Loesche und Syed (1993), Edwardsson (1974), Botha et al. (1998) und Bjørndal und Larsen (2000). Der geringe Stichprobenumfang der Untersuchungen von Hoshino (1985) lässt einen Vergleich der gewonnenen Ergebnisse nicht zu.

Es zeigt sich deutlich, dass die Laktobazillen, die den kariösen Prozess im erweichten Dentin bestimmen, durch *L. rhamnosus*, *L. paracasei* ss *paracasei*, *L. paracasei* ss *tolerans* und *L. gasseri* repräsentiert werden. Nach Exkavation des erweichten kariösen Dentins und der Applikation von Ca(OH)_2 reduzierte sich das Keimspektrum auf *L. rhamnosus* und auf *L. paracasei* ss *tolerans* und ebenso die Gesamtkeimzahl am harten Kavitätenboden (Tab. 3). Die Applikation von Ca(OH)_2 dürfte entscheidend zur Reduktion der azidophilen Laktobazillen beigetragen haben. Der definitive Kavitätenverschluss und somit die Unterbindung der Nährstoffzufuhr zum harten Kavitätenboden sowie die Exkavation des erweichten kariösen Dentins stellen weitere Faktoren dar, die eine quantitative und qualitative Veränderung der Mikroflora am hart kariös veränderten Kavitätenboden bewirken.

Der Selektionsvorteil für *L. rhamnosus* könnte auf der Fähigkeit der Laktobazille beruhen, aus extrazellulären Polysacchariden eine schützende Schleimkapsel bilden zu können, die zugleich als Nährstoffreserve dienen dürfte.

Heinrich und Kneist (1986) konnten in ihrer klinisch-mikrobiologischen und histologischen Therapiestudie an 70 Milchmolaren mit Caries profunda verdeutlichen, dass die Restbesiedlung des harten Kavitätenbodens mit Laktobazillen eng mit einer entzündlich veränderten Pulpa vergesellschaftet war. Martin et al. (2002) und Byun et al. (2004) gingen nahezu 20 Jahre später erneut dem Keimspektrum kariöser Progressionstadien in Beziehung zur pulpalen Entzündung an einer gemeinsamen Grundgesamtheit von 65 extrahierten bleibenden Zähnen nach. Das mikrobiologische Methodenspektrum war zeitgemäß. Bei Korrelation der mikrobiologischen Befunde aus dem kariösen Dentin mit dem Pulpastatus der gleichen Zähne wurden von Martin et al. (2002) *M. micros* und *P. endodontalis* für degenerative Entzündungen der Pulpa verantwortlich gemacht und von Byun et al. (2004) *L. rhamnosus* und *L. gasseri*. Heinrich und Kneist (1986) verfolgten hingegen die Veränderungen der Mikroflora nach Kariesexkavation in einem Beobachtungszeitraum von 11 Monaten, erfassten das komplexe und lebensfähige Keimspektrum am Kavitätenboden nicht selektiv sondern auf Hirn-Herz-Blutagar und setzten das gesamte Keimspektrum in Beziehung zum histologisch verifizierten Pulpastatus, der auch eine Bakterienfärbung einschloss. War die Pulpa entzündungsfrei, restierten bei positivem

histobakteriologischen Befund kulturell Aktinomyzeten am klinisch harten Kavitätenboden; bei pulpaler Entzündung waren es hingegen Mutans-Streptokokken und/oder Laktobazillen. Letztere erwiesen sich nach zeitgemäßer Identifizierung heute als *L. rhamnosus* und *L. paracasei* ss tolerans.

Die zuvor zitierte Autorengruppe um Martin und Byun ging 2005 erneut der mikrobiellen Diversität der fortschreitenden kariösen Front an 10 permanenten Prämolaren und Molaren mit molekularbiologischen Methoden nach (Chour et al. 2005). Laktobazillen (darunter *L. rhamnosus*) gemeinsam mit Prevotellen dominierten das Keimspektrum mit 50%. Daneben wurden *Selenomonas spec.*, *Dialister spec.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium spec.*, *Bifidobacterium spec.*, *Propionibacterium spec.*, *Olsenella spec.* und *Pseudoramibacter spec.* nachgewiesen. Die Autoren ließen in dieser Studie bei vorhandener Pulpahistologie offen, welchen Angriffspunkt bzw. welche Wirkungsweise ein solches diverses Keimspektrum die kariöse Läsion vorantreibt bzw. eine vitale Pulpa infizieren kann; allerdings ließ diese Aussagen das Studiendesign auch nicht zu.

Bislang kann keine Studie gleich Heinrich und Kneist (1986) so klar aufzeigen, dass *L. rhamnosus* unter den Laktobazillen für pulpale Entzündungen verantwortlich sein dürfte. Mit über 200 Fällen untermauern Aguirre und Collins (1993), Gasser (1994) und Cannon et al. (2005), dass Laktobazillen bei verschiedenen Infektionen wie Bakteriämie, Endokarditis oder lokalen Infektionen involviert sind. Innerhalb der Gattung *Lactobacillus* werden dafür besonders die Arten *L. casei* und *L. rhamnosus* verantwortlich gemacht (Cannon et al. 2005). Diskussionen bestehen darüber, ob Laktobazillen als wirkliche Pathogene oder als Opportunisten, die unter bestimmten Umständen (Erkrankungen als prädisponierende Faktoren) ein pathogenes Potential besitzen, angesehen werden sollten (Aguirre und Collins 1993; Gasser 1994; Cannon et al. 2005). Wie auch immer konnte bislang gezeigt werden, dass *L. rhamnosus* Eigenschaften wie die Adhärenz besitzt, an Gewebe adhärieren kann und Entzündungen durch die Kolonisation hervorruft (Cannon et al. 2005).

Letztlich, wenn durch Randspalten insuffizienter Füllungen Nährstoffe zum Kavitätenboden diffundieren, wird das Überleben restierender Mikroorganismen – darunter auch *L. rhamnosus* – gefördert.

7 Schlussfolgerungen

Die Identifizierung von Laktobazillen aus Speichel, Plaque oder kariösem Dentin mit biochemischen und physiologischen Testverfahren allein ist begrenzt; dies gilt gleichermaßen für molekularmethodische Methoden wie die PCR. Ein Methodenspektrum erweitert die Begrenzung einzelner Verfahren zur objektiven Identifizierung von Keimgruppen.

Mit 20 für die Mundhöhle repräsentativen Arten von Referenzstämmen der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, BRD) konnte erfolgreich eine massenspektrometrische Datenbank (MALDI-TOF-MS) für ausgewählte Laktobazillen erstellt werden. Dies ist analog für andere Keimgruppen denkbar.

In Verbindung mit ausgewählten physiologischen und biochemischen Eigenschaften der Arten – wie beispielsweise der Rhamnosereaktion – ist die Differenzierung zwischen eng verwandten Arten, hier *L. paracasei* ss *paracasei* und *L. rhamnosus*, möglich.

Auf der Basis der vorliegenden Datenbank konnten 81 von 90 oralen Laktobazillenisolaten identifiziert und die ätiopathogenetische Bedeutung von *L. rhamnosus* für die kariöse Progression aufgezeigt werden.

Die Datenbank lässt die Erweiterung durch Spektren oraler Laktobazillen zu und kann damit zukünftigen Ansprüchen der oralen Mikrobiologie besser genügen.

Die Erweiterung massenspektrometrischer Datenbanken durch Spektren anderer oraler Keimgruppen ist denkbar und dürfte – wie hier am Beispiel der Dentinkaries – zur Objektivierung der mikrobiellen Situation unterschiedlicher oraler Biotope beitragen.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. 2008. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol*, 46(4):1407-1417.
- 2 Abbott F. 1879. Wirkung der Gärungsproduktion auf verschiedene Gebiete der Mundhöhle. In: Miller WD, Hrsg. *Mikroorganismen der Mundhöhle*. Zweite Auflage. Leipzig: Thieme Verlag, 112-131.
- 3 Alikhanov SG. 1956. A new impulse technique for ion mass Measurements. *Soviet J Exptl Theoret Phys*, 31:517-518.
- 4 Anhalt JP, Fenselau C. 1975. Identification of bacteria using mass-spectrometry. *Anal Chem*, 47:219-225.
- 5 Arnold RJ, Reilly JP. 1998. Fingerprint matching of *E. coli* strains with matrix-assisted laser desorption/ionization time off flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 12:630-636.
- 6 Aguirre M, Collins MD. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infections. *J Appl Bact*, 75:95-107.
- 7 Baake K. 2003. Zur Säureproduktion und Säuretoleranz ausgewählter oraler Laktobazillen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- 8 Bauer H. 2004. Säureproduktion und Säuretoleranz oraler Aktinomyzeten [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- 9 Bergholz T. 2002. Säureproduktion und Säuretoleranz bei humanen Stämmen von *Streptococcus mutans* [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- 10 Bjørndal L, Larsen T. 2000. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res*, 34(6):502-508.
- 11 Black GV. 1886. Gelantine forming microorganisms. *Indep Pract*, 546-562.
- 12 Black GV. 1914. *Konservierende Zahnheilkunde*. Berlin: Meusser Verlag.
- 13 Botha SJ, Boy SC, Botha FS, Senekal R. 1998. *Lactobacillus* species associated with active caries lesions. *J D A S A*, 53:3-6.

- 14 Bridgeman. 1863. Wirkung der Gärungsproduktion auf verschiedene Gebiete der Mundhöhle. In: Miller WD, Hrsg. Mikroorganismen der Mundhöhle. Zweite Auflage. Leipzig: Thieme Verlag, 112-131.
- 15 Bright JJ, Claydon MA, Soufian M, Gordon DB. 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. J Microbiol Methods, 48:127–138.
- 16 Buckenhüskes H, Schneider M, Hammes WP. 1986. Die milchsaure Vergärung pflanzlicher Rohware unter besonderer Berücksichtigung der Herstellung von Sauerkraut. Chem Mikrobiol Technol Lebensm, 10:42-53.
- 17 Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. 2004. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. J Clin Microbiol, 42(7):3128-3136.
- 18 Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. 2005. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. Eur J Microbiol Infect Dis, 24:31-40.
- 19 Chhour K-L, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. 2005. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. J Clin Microbiol, 43(2):843-849.
- 20 Clark JK. 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. Br J Exp Pathol, 5:141-147.
- 21 Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nat Biotechnol, 14:1584-1586.
- 22 Crossner CG. 1981. Salivary lactobacillus counts in the prediction of caries activity. Comm Dent oral Epidemiol, 9:182-190.
- 23 Drews G. 1983. Mikrobiologisches Praktikum. Vierte Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.
- 24 Edward-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. 2000. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. J Med Microbiol, 49:295–300.

-
- 25 Edwardsson S. 1974. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. *Odontol Rev*, 25:(32):1-143.
 - 26 Erhard M, von Dohren H, Jungblut P. 1997. Rapid typing and elucidation of new secondary metabolites of intact cyanobacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol*, 15:906-909.
 - 27 Fenselau C, Demirev PA. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*, 20:157-171.
 - 28 Fitzgerald RJ, Jordan HV, Archad HO. 1966. Dental caries in gnotobiotic rats infected with variety of *Lactobacillus acidophilus*. *Arch oral Biol*, 11:473-476.
 - 29 Gasser F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull Inst Pasteur*; 92:45-67.
 - 30 Gevers D, Huys G, Swings J. 2001. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett*, 205(1):31-36.
 - 31 Gibbons RJ, Armstrong WD. 1964. Bacteriology of Dental Caries. *J Dent Res*, 43 (6):1021-1028.
 - 32 Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist C, Grahnen H, Bonow BE, Krasse B. 1954. The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand*, 11(3-4):232-64.
 - 33 Hamada S, Slade HD. 1980. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*, 44:331-384.
 - 34 Heinrich R, Kneist S. 1986. Die Vitalerhaltung des Milchendodonts – Eine klinisch-mikrobiologische und histologische Studie. [Habilitation]. Jena/Erfurt: Friedrich-Schiller-Universität.
 - 35 Heinrich-Weltzien R, Kneist S, Fischer Th, Stößer L. 1998. Ist eine effektive Kariesprävention ohne Fissurenversiegelung möglich? *Quintessenz*, 11:1099-1108.
 - 36 Heinrich-Weltzien R, Kühnisch J, Senkel H, Stößer L. 1998. Welchen Beitrag leistet die Fissurenversiegelung zur Zahngesundheit. *Oralprophylaxe Kinderzahnheilkd*, 20:146-154.

-
- 37 Hellwig E, Klimek J, Attin Th. 1999. Einführung in die Zahnerhaltung. Zweite Aufl. München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 12-22.
 - 38 Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. 1991. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of biopolymers. *Anal Chem*, 63:1193A-1203A.
 - 39 Hoshino E. 1985. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res*, 64(10):1195-1198.
 - 40 Jarman KH, Cebula ST, Saenz AJ, Peterson CE, Valentine NB, Kingsley MT, Wahl KL. 2000. An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Anal Chem*, 72(6):1217–1223.
 - 41 Kaetzke A, Körner H, Kneist S, Eschrich K. 2003. Unambiguous Macroscopic classification of oral *Actinomyces* isolates forming red colonies on brain heart blood agar to the species *A. odontolyticus*. *J Clin Microbiol*, 41(8):3729-3731.
 - 42 Kandler O, Weiss N. 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. In: Sneath PHA, Mair N, Sharpe ME, Holt JG, eds. *Bergeys manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Baltimore: Williams and Wilkins, 1208-1234.
 - 43 Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F. 1987. Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 78:53-68.
 - 44 Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. 1985. Influence of the wavelength in high-irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of organic molecules. *Anal Chem*, 57:2935-2939.
 - 45 Karas M, Hillenkamp F. 1988. Laser Desorption Ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons. *Anal Chem*, 60:2299-2301.
 - 46 Karataev VI, Mamyrin BA, Shmikk DV. 1972. New Method for Focusing Ion Bunches in Time-of-Flight Mass Spectrometers. *Soviet Phys-Technical Phys*, 16:1177-1179. Übersetzt aus: *Zh Eksp Theor Fiz* (1971), 41:1498-1501.
 - 47 Kaufmann R, Chaurand P, Kirsch D, Spengler B. 1996. Post-source Decay and Delayed Extraction in Matrix-assisted Laser

- Desorption/Ionization-Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometry. Are there tradeoffs?. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 10:1199-1208.
- 48 Keyes PH. 1962. Recent advances in dental caries research. *Int Dent J*, 12:443.
- 49 Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Tietze W, Schumann V, Stöcker L. 1998. Die mikrobielle Mundhöhlenbesiedlung als Grundvoraussetzung des Kariesrisikos – Eine Übersicht der Befunde aus der Erfurter Studie. In: Stöcker L, Hrsg. *Kariesdynamik und Kariesrisiko*. Berlin: Quintessenz Verlag, 201-213.
- 50 Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Tietze W, Schumann V, Stöcker L. 1998. Die mikrobielle Mundhöhlenbesiedlung als Grundvoraussetzung des Kariesrisikos – Eine Übersicht der Befunde aus der Erfurter Studie. In: Stöcker L, Hrsg. *Kariesdynamik und Kariesrisiko*. Berlin: Quintessenz Verlag, 201-213.
- 51 König K. 1971. *Karies und Kariesprophylaxe*. Erste Aufl. München: Goldmann.
- 52 Krah A, Schmidt F, Becher D, Schmid M, Albrecht D, Rack A, Büttner K, Jungblut P. 2003. Analysis of automatically generated peptide mass fingerprints of cellular proteins and antigens from *Helicobacter pylori* 26695 separated by two-dimensional electrophoresis. *Mol Cell Proteomics*, 2(12):1271-1283.
- 53 Larmas M. 1975. A new dip-slide technic for counting of salivary lactobacilli. *Proc Finn Dent Soc*, 71(2):31-35.
- 54 Larmas M. 1985. Simple tests for caries susceptibility. *Int Dent J*, 35(2):109-117.
- 55 Lee J, Jang J, Kim B, Kim J, Jeong G, Han H. 2004. Identification of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* by multiplex PCR-based restriction enzyme analysis. *J Microbiol Methods*, 59(1):1-6.
- 56 Loesche WJ, Syed SA. 1973. The Predominant cultivable flora of carious Plaque and carious Dentin. *Caries Res*, 7(3):201-216.
- 57 Loesche WJ. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 50:353-380.

-
- 58 Lussi A, Francescut P, Schaffner M. 2003. Neue und konventionelle Methoden zur Diagnose der Fissurenkaries. *Quintessenz*, 54(10):1037-1046.
- 59 Lussi A, Schaffner M. 2002. Diagnose und Therapie der Karies. *Schweiz Med Forum*, 8:166-170.
- 60 Magitots. 1867. Wirkung der Gärungsproduktion auf verschiedene Gebiete der Mundhöhle. In: Miller WD, Hrsg. *Mikroorganismen der Mundhöhle*. Zweite Auflage. Leipzig: Thieme Verlag, 112-131.
- 61 Mamyrin BA, Karataev VI, Shmikk DV, Zagulin VA. 1973. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Soviet Phys-JETP*, 37:45-48. Übersetzt aus: *Zh Eksp Theor Fiz* (1973), 64:82-89.
- 62 Mamyrin BA, Shmikk DV. 1979. The linear massreflectron. *Soviet Phys-JETP*, 49:762-764. Übersetzt aus: *Zh Eksp Theor Fiz* (1979), 76:1500-1505.
- 63 Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. 2001. The predominant microflora of nursing carious lesions. *Caries Res*, 35(6):397-406.
- 64 Marsh PD. 2006. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6(Suppl. I):S14.
- 65 Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. 2002. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and realtime PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol*, 40:1698–1704.
- 66 Medzihradszky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL. 2000. The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF Tandem Mass Spectrometer. *Anal Chem*, 72:552-558.
- 67 Michalek SM, Hirasawa M, Kiyono H, Ochiai K, McGhee JR. 1981. Oral ecology and virulencia of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. *Infect Immun*, 33:690-696.
- 68 Miller WD. 1889. *Die Mikroorganismen der Mundhöhle*. Leipzig: Thieme Verlag.

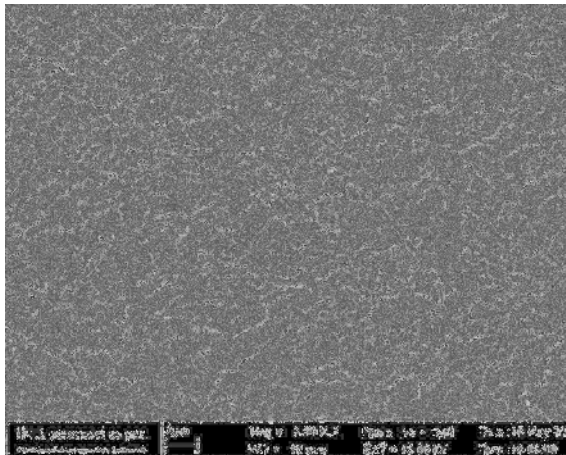
-
- 69 Nagano T. 1960. Relation between the form and pit and fissure and the primary lesion of caries. *Shikwa Gakuto*, 60:80-90.
- 70 Nilsson CL. 1999. Fingerprinting of *Helicobacter pylori* strains by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13:1067–1071.
- 71 Orland FJ, Blayney JR, Harison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA, Wagner M. 1955. Experimental caries in germ free rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc*, 50:259-273.
- 72 Orland FJ, Blayney JR, Harison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD. 1954. Use of the germfree animal technique in the study of the experimental dental caries. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res*, 33:147-174.
- 73 Rogosa M, Mitchell JA, Wisemann RF. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and faecal *Lactobacilli*. *J Bacteriol*, 62:132-133.
- 74 Rogosa M, Wisemann R, Mitchell JA, Disrealy M. 1953. Species differentiation of oral *Lactobacilli* from man including descriptions of *Lactobacillus salivarius* nov. spec. and *Lactobacillus cellobiosus* nov. spec. *J Bacteriol*, 65:681-699.
- 75 Rupf S, Merte K, Eschrich K, Stösser L, Kneist S. 2001. Peroxidase reaction as a parameter for discrimination of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 35:258-264.
- 76 Rupf S, Breitung K, Schellenberger W, Merte K, Kneist S, Eschrich K. 2005. Differentiation of *mutans streptococci* by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol Immunol*, 20:267-273.
- 77 Rupf S, Kneist S, Merte K, Eschrich K. 1999. Quantitative determination of *Streptococcus mutans* by using competitive polymerase chain reaction. *Eur J Oral Sci*, 107:75-81.
- 78 Russell DH, Edmondson RD. 1997. High-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements with emphasis on the characterization of peptides and proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J Mass Spectrom*, 32:263-276.

-
- 79 Schmidt F, Schmid M, Jungblut PR, Mattow J, Facius A, Pleissner K-P. 2003. Iterative data analysis is the key for exhaustive analysis of peptide mass fingerprints from proteins separated by two-dimensional electrophoresis. *J Am Soc Mass Spectrom*, 14(9):943-956.
- 80 Seppä L, Luoma H, Forss H, Spets-Happonen S, Markkanen S, Pelkonen K. 1987. Invasion of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus salivarius* in early caries lesions of gnotobiotoc rats. *Caries Res*, 23:371-374.
- 81 Shovlin FE, Gillis RE. 1969. Biochemical and antigenic studies of lactobacilli isolates from deep dentinal caries. I Biochemical aspects. *J Dent Res*, 48:356-360.
- 82 Shovlin FE, Gillis RE. 1972. Biochemical and antigenic studies of lactobacilli isolates from deep dentinal caries. II Antigenetic aspects. *J Dent Res*, 51:356-360, 583-587.
- 83 Snyder ML. 1951. Laboratory methods in the clinical evaluation of caries activity. *J Am Dent Assoc*, 42:400-413.
- 84 Song Y, Kato N, Liu C, Matsumiya Y, Kato H, Watanabe K. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett*, 187(2):167-173.
- 85 Steiner M, Menghini G, Curilovic Z, Marthaler T. 1994. Der Kariesbefall der Schüler der Stadt Zürich im Zeitraum 1970-1993. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 104(10):1210-1218.
- 86 Van Houte J. 1980. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int Dent J*, 30:305-326.
- 87 Vestal ML, Juhasz P, Martin SA. 1995. Delayed extraction Matrix-Assisted Laser Desorption Time-of-Flight MassSpectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 9:1044-1050.
- 88 Warscheid B, Fenselau C. 2004. A targeted proteomics approach to the rapid identification of bacterial cell mixtures by matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Proteomics*, 4:2877-2892.
- 89 Wicht MJ, Haak R, Schütt-Gerowitt H, Kneist S, Noak MJ. 2004. Suppression of caries-related microorganisms in dentine lesions after

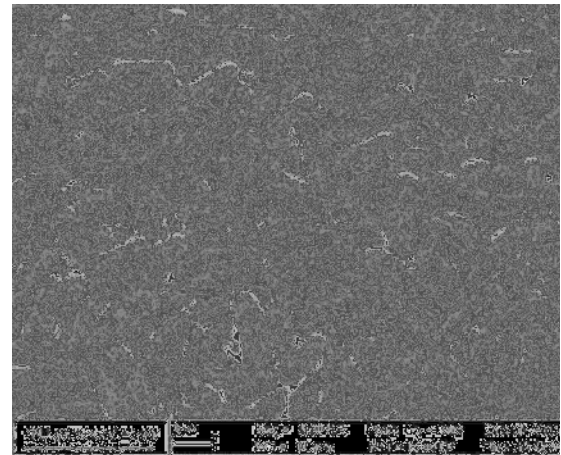
-
- short-term chlorhexidine or antibiotic treatment. Caries Res, 38(5)436-441.
- 90 Wicht MJ. 2005. Persönliche Mitteilung: Sequenzierungsergebnisse Laktobazillen, Referenzstämme.
- 91 Øshizumi H. 1975. A malo lactic bacterium and its growth factor. In: Carr JG, Cutting CV, Whiting GC, eds. Lactic acid bacteria in beverages and food. London, New York, SF: Academic Press, 87-102.

9 Anhang

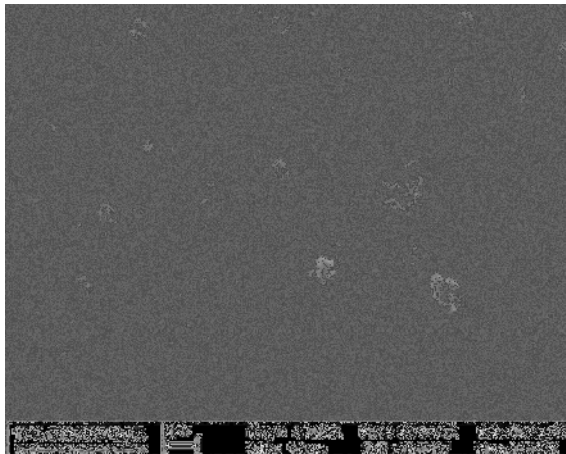
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen



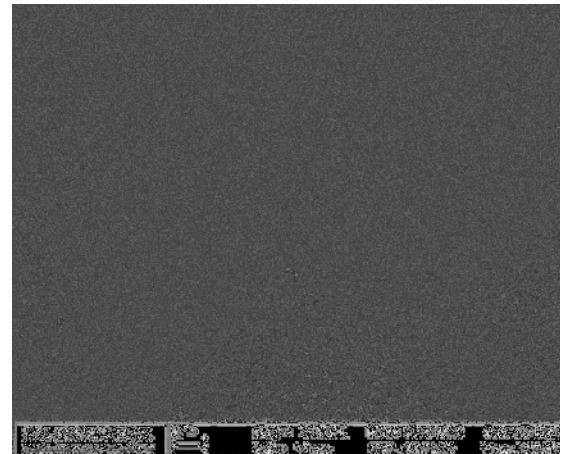
L. paracasei ss paracasei DSMZ 5457, unverdaut



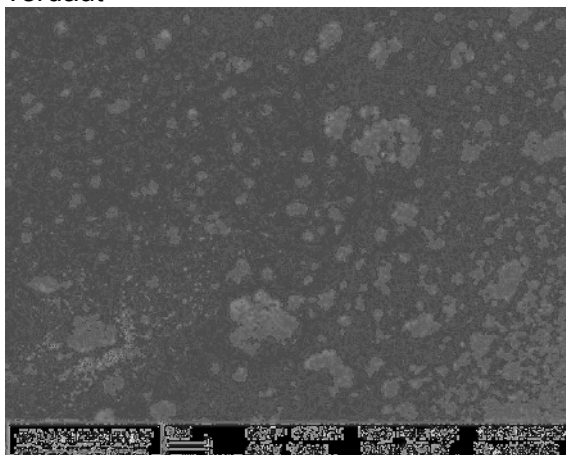
L. paracasei ss paracasei DSMZ 5457, unverdaut



L. paracasei ss paracasei DSMZ 5457, verdaut

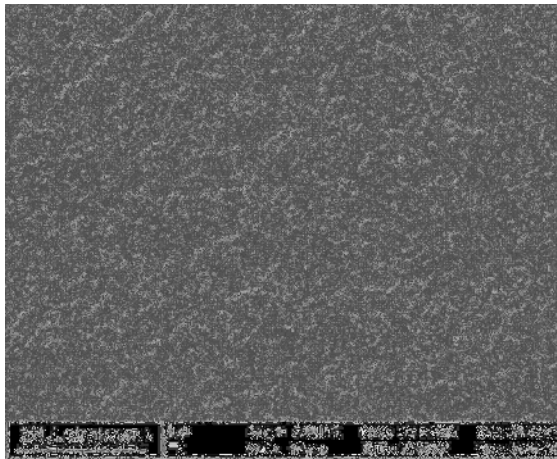


L. paracasei ss paracasei DSMZ 5457, verdaut

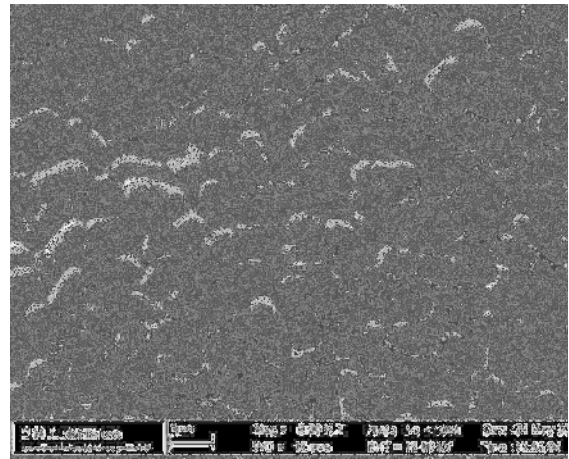


L. paracasei ss paracasei DSMZ 5457, verdaut

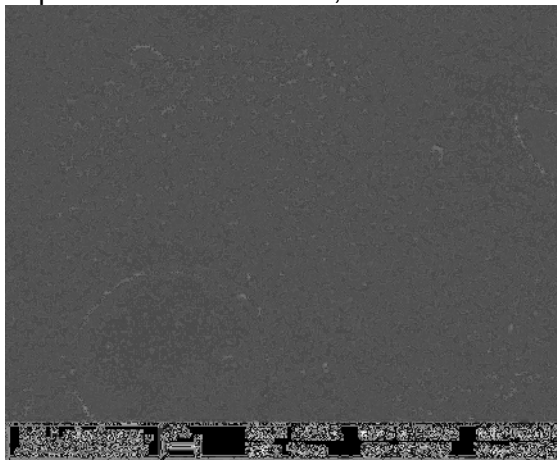
Abbildung 1: L. paracasei ss paracasei DSMZ 5457 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



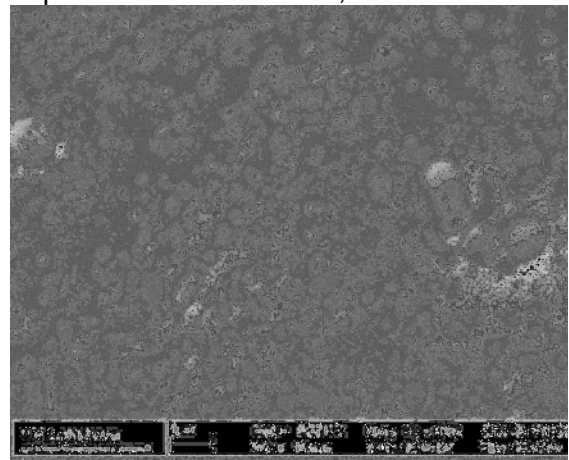
L. plantarum DSMZ 2601, unverdaut



L. plantarum DSMZ 2601, unverdaut



L. plantarum DSMZ 2601, verdaut



L. plantarum DSMZ 2601, verdaut

Abbildung 2: L. plantarum DSMZ 2601 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

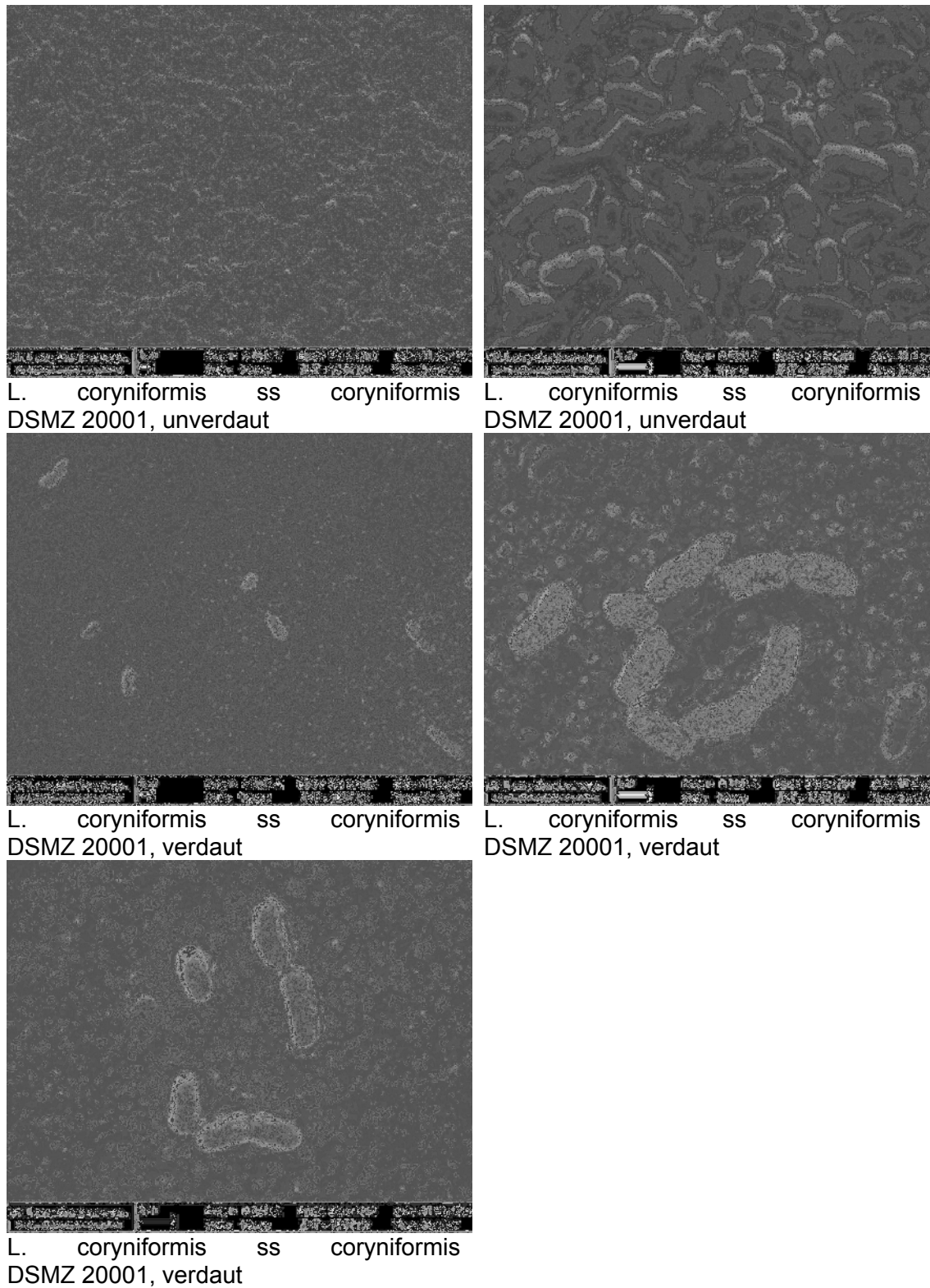


Abbildung 3: *L. coryniformis* ss *coryniformis* DSMZ 20001 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

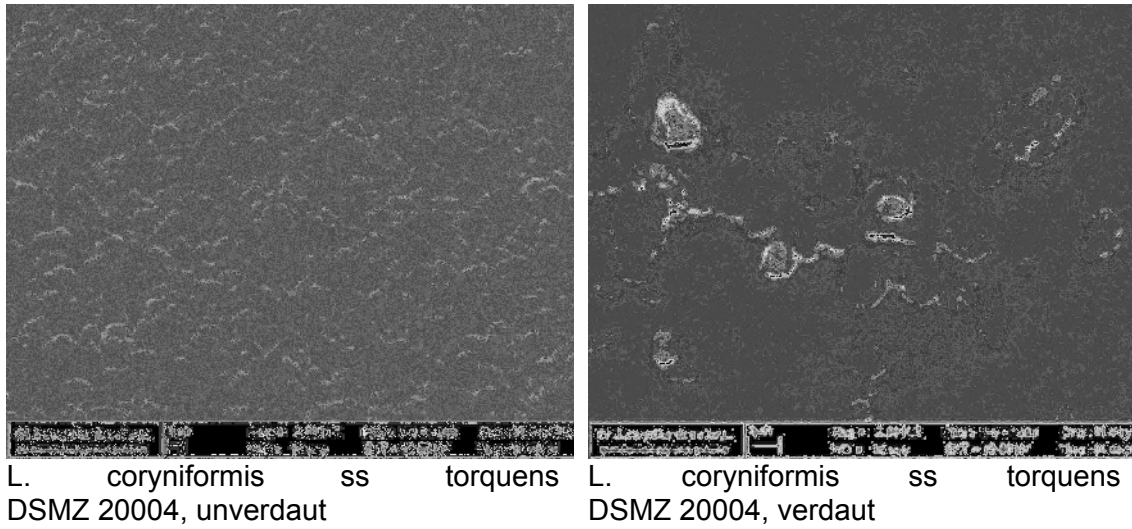
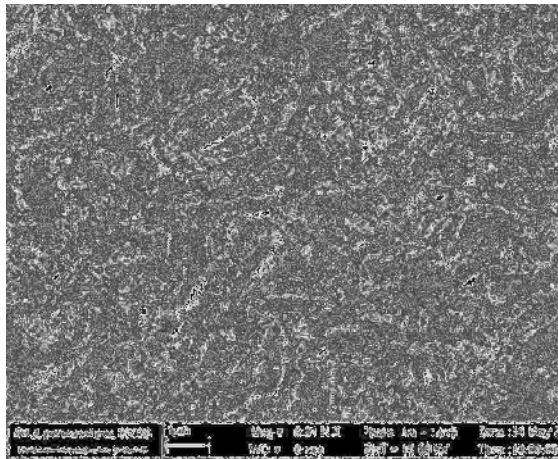
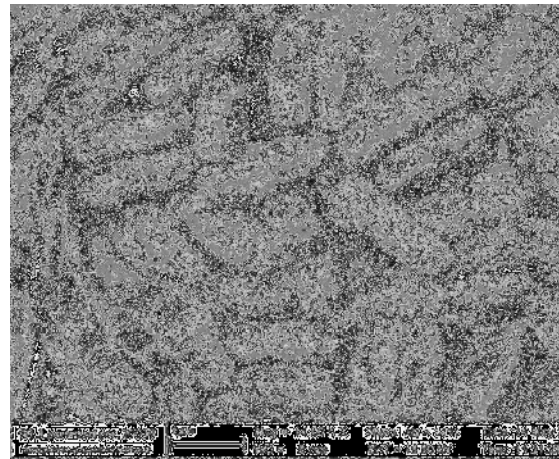


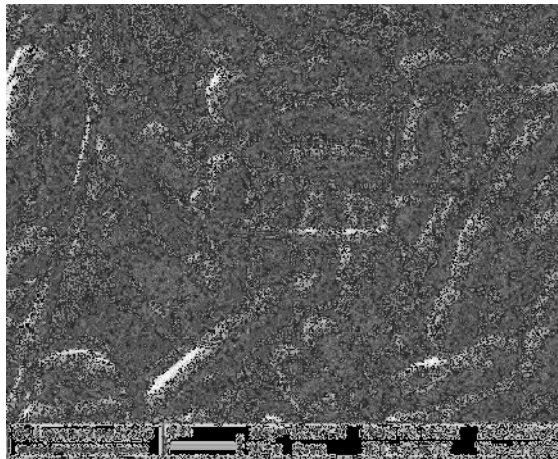
Abbildung 4: *L. coryniformis* ss *torquens* DSMZ 20004 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



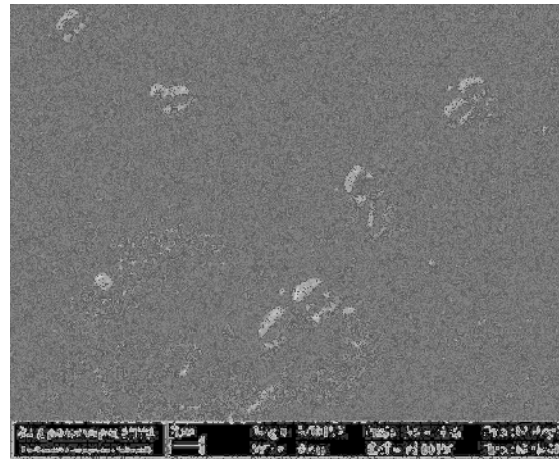
L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008, unverdaut



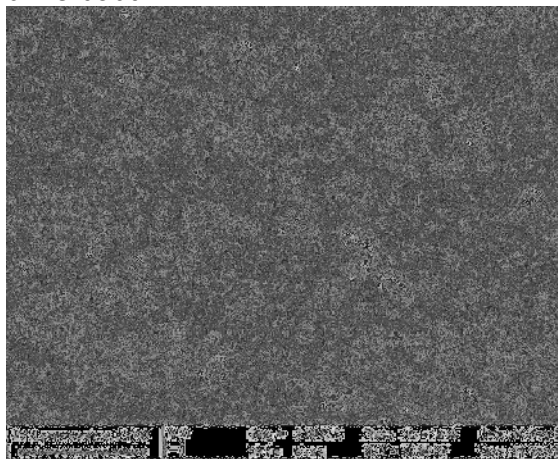
L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008, unverdaut



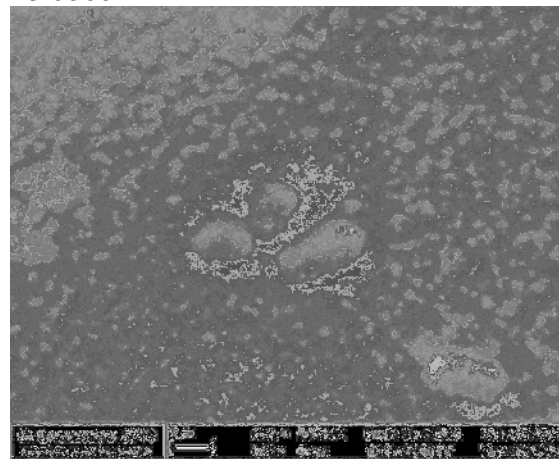
L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008, unverdaut



L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008, verdaut

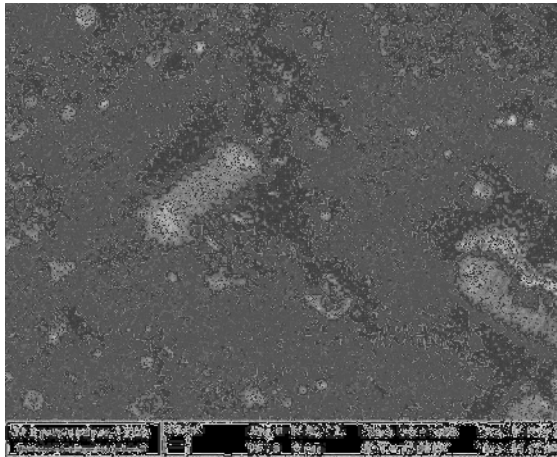


L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008, verdaut

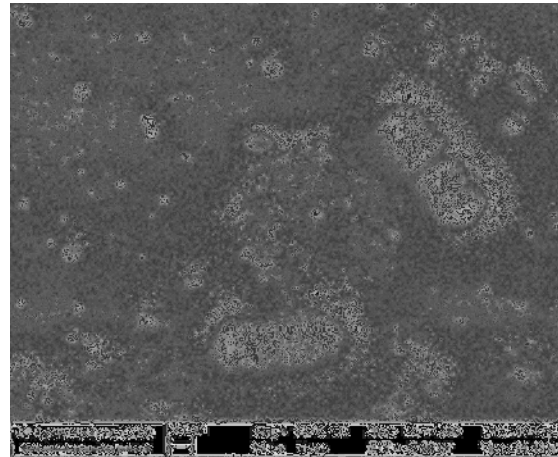


L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008, verdaut

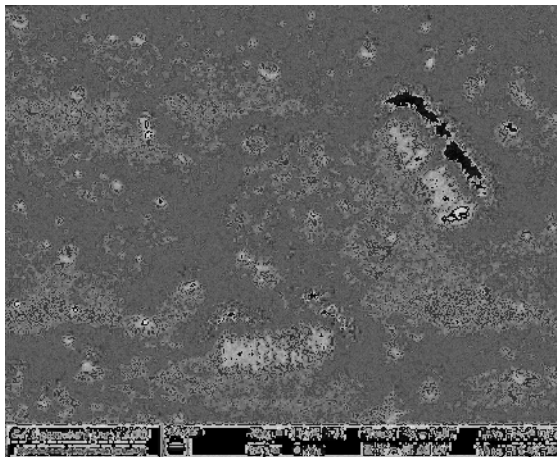
Abbildung 5: L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- bis 14000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008,
verdaut



L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008,
verdaut



L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008,
verdaut

Abbildung 5a: L. paracasei ss paracasei DSMZ 20008 nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 14000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

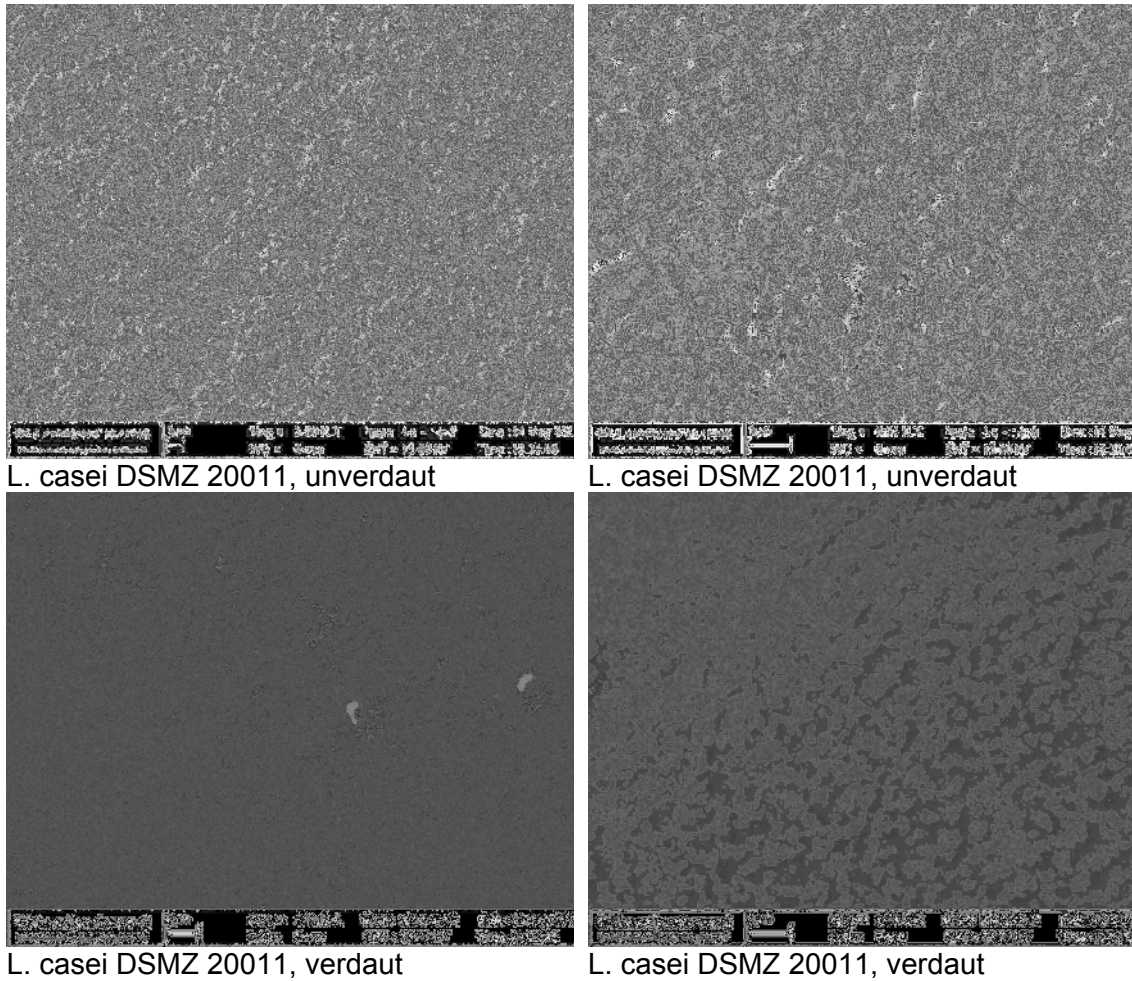
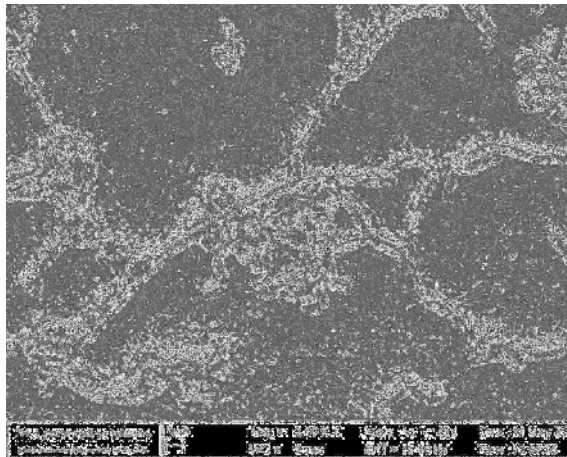
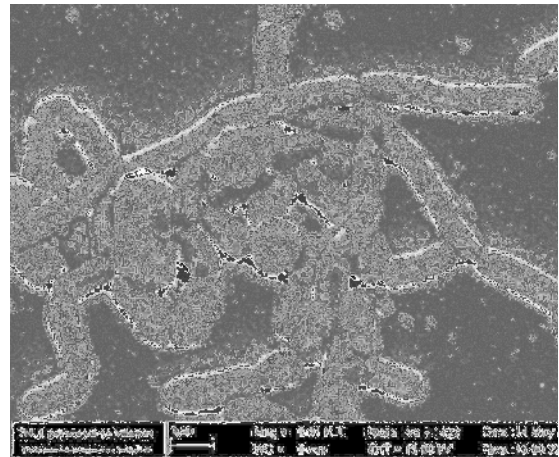


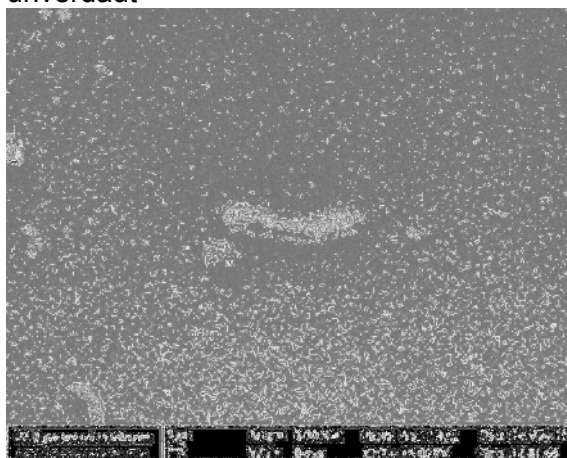
Abbildung 6: *L. casei* DSMZ 20011 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



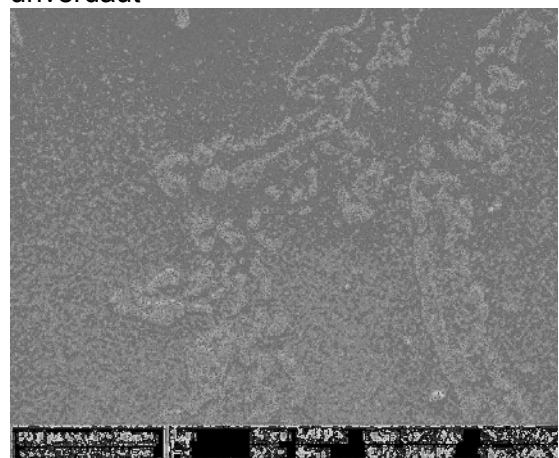
L. casei ss tolerans DSMZ 20012, unverdaut



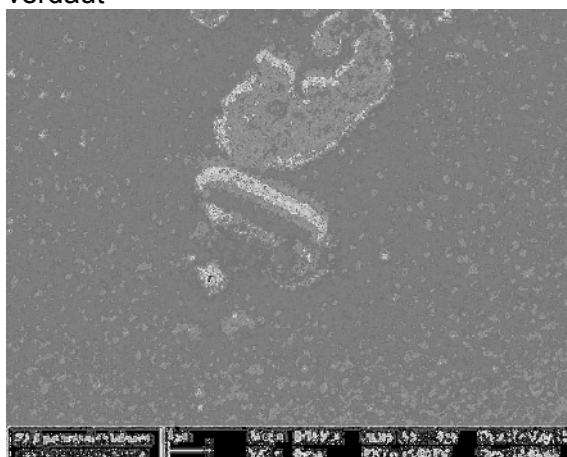
L. casei ss tolerans DSMZ 20012, unverdaut



L. casei ss tolerans DSMZ 20012, verdaut

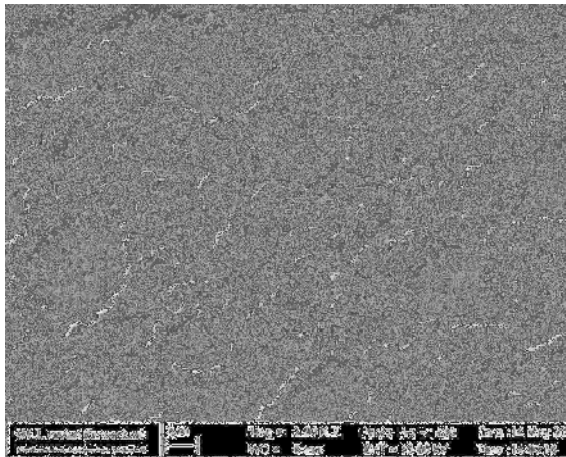


L. casei ss tolerans DSMZ 20012, verdaut

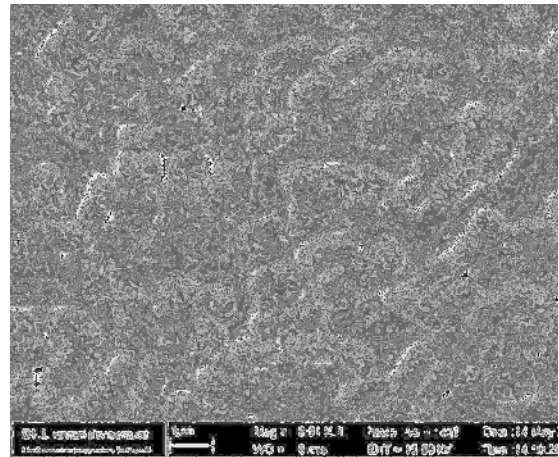


L. casei ss tolerans DSMZ 20012, verdaut

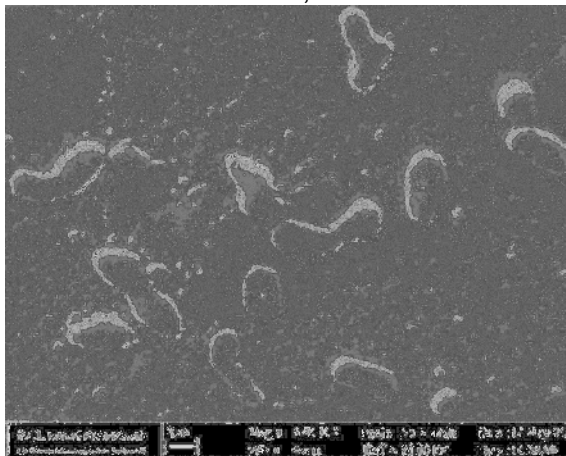
Abbildung 7: *L. casei* ss tolerans DSMZ 20012 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



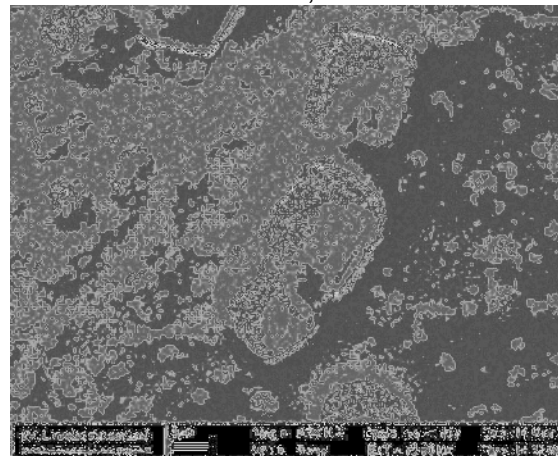
L. reuteri DSMZ 20016, unverdaut



L. reuteri DSMZ 20016, unverdaut

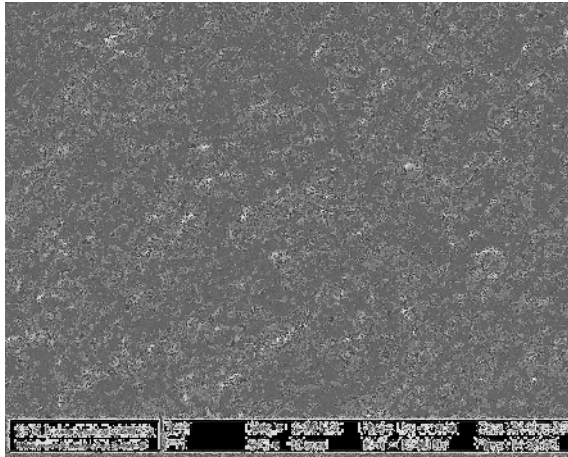


L. reuteri DSMZ 20016, verdaut

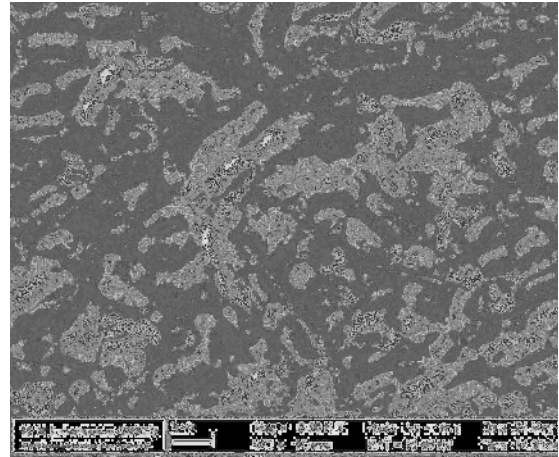


L. reuteri DSMZ 20016, verdaut

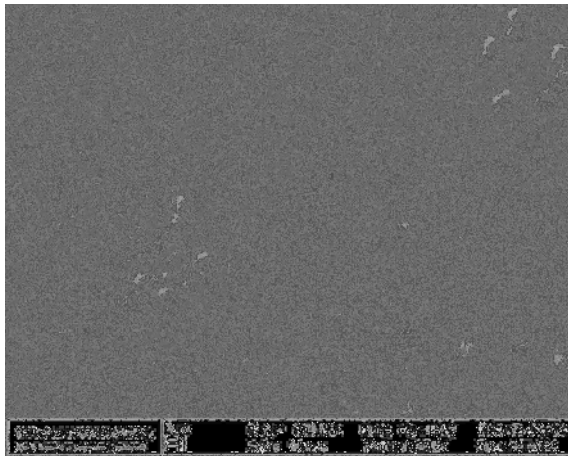
Abbildung 8: L. reuteri DSMZ 20016 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



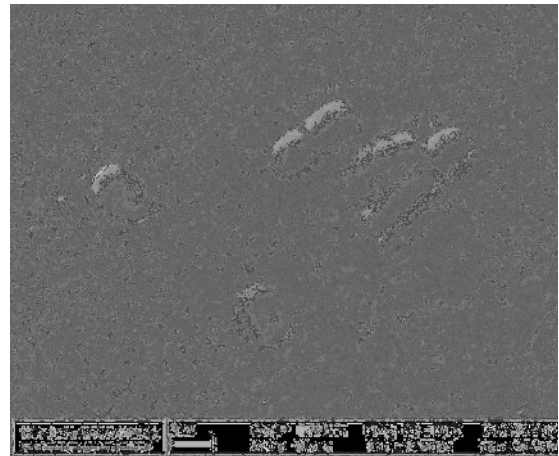
L. casei ss rhamnosus DSMZ 20022, unverdaut



L. casei ss rhamnosus DSMZ 20022, unverdaut

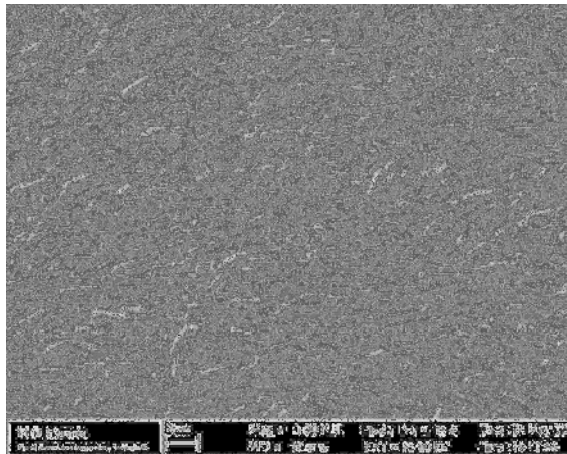


L. casei ss rhamnosus DSMZ 20022, verdaut

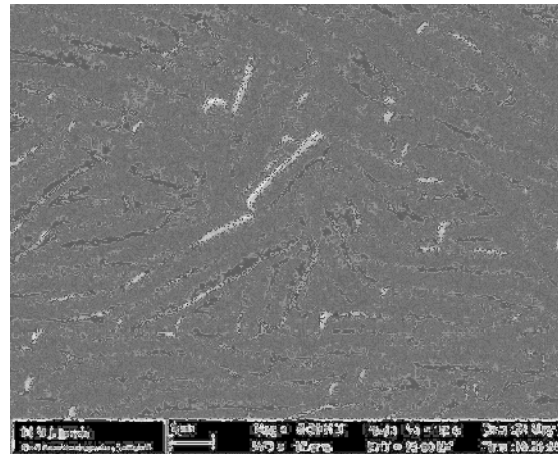


L. casei ss rhamnosus DSMZ 20022, verdaut

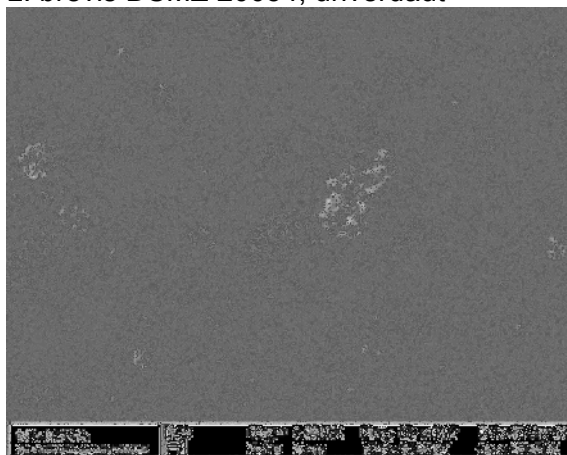
Abbildung 9: L. casei ss rhamnosus DSMZ 20022 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



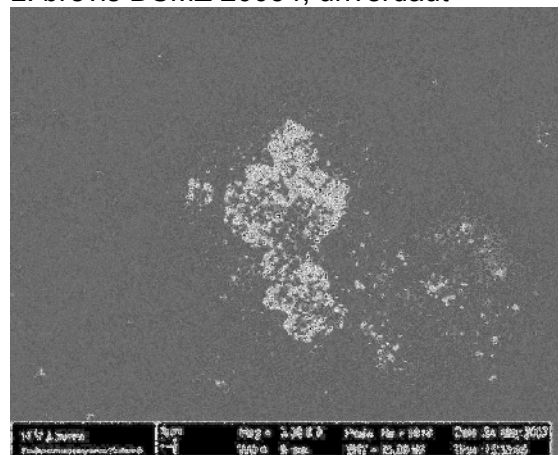
L. brevis DSMZ 20054, unverdaut



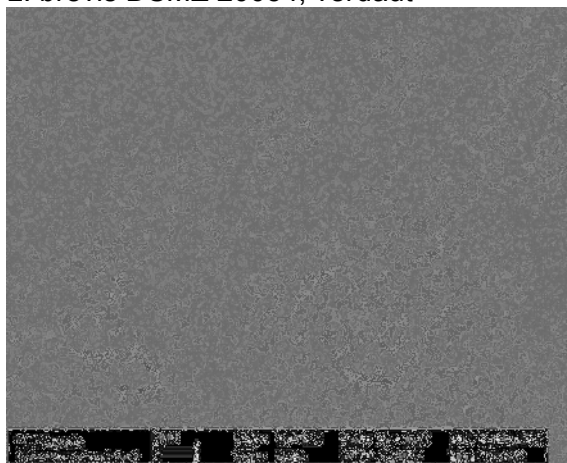
L. brevis DSMZ 20054, unverdaut



L. brevis DSMZ 20054, verdaut

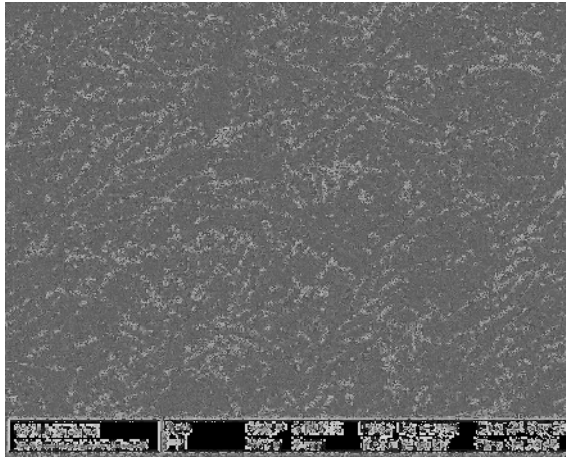


L. brevis DSMZ 20054, verdaut

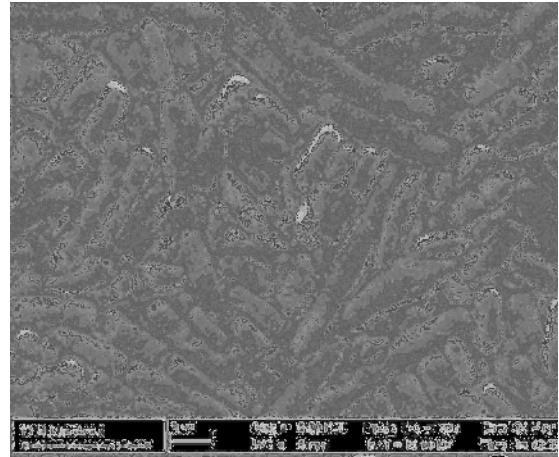


L. brevis DSMZ 20054, verdaut

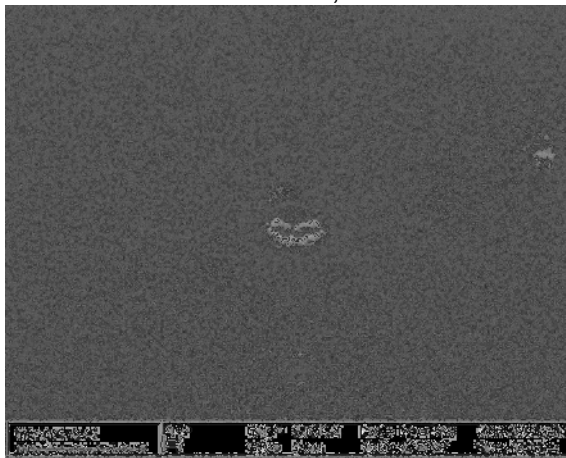
Abbildung 10: L. brevis DSMZ 20054 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



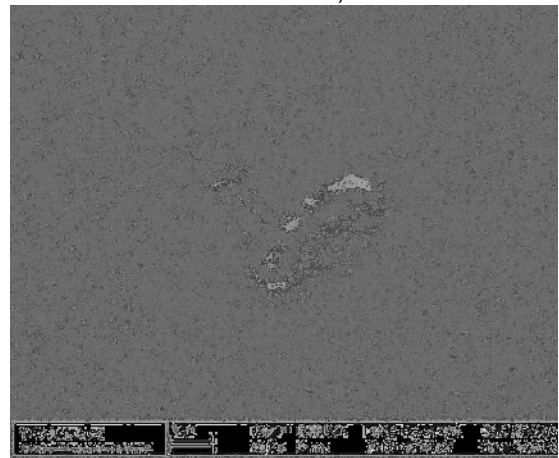
L. buchneri DSMZ 20057, unverdaut



L. buchneri DSMZ 20057, unverdaut

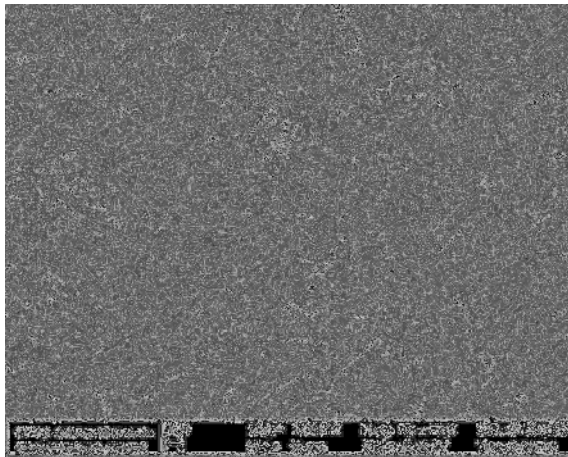


L. buchneri DSMZ 20057, verdaut

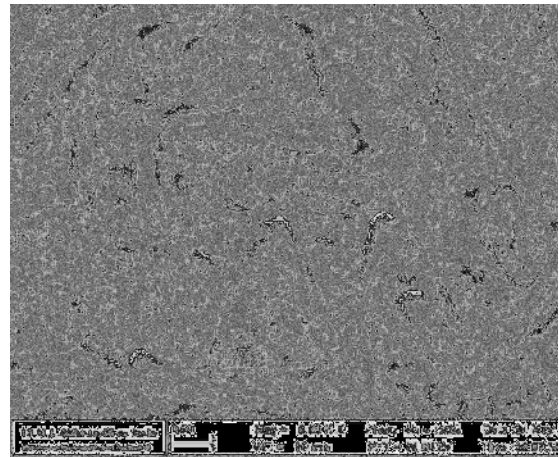


L. buchneri DSMZ 20057, verdaut

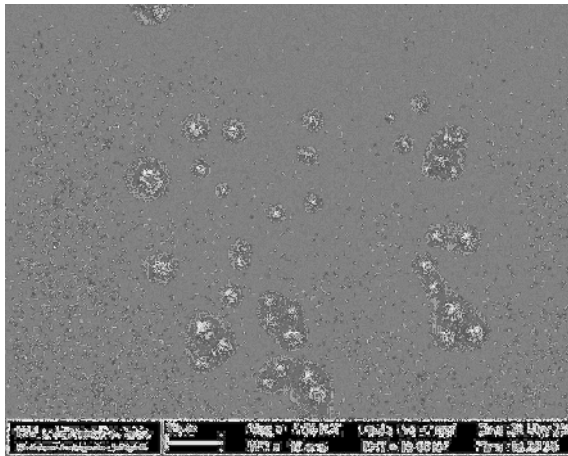
Abbildung 11: L. buchneri DSMZ 20057 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



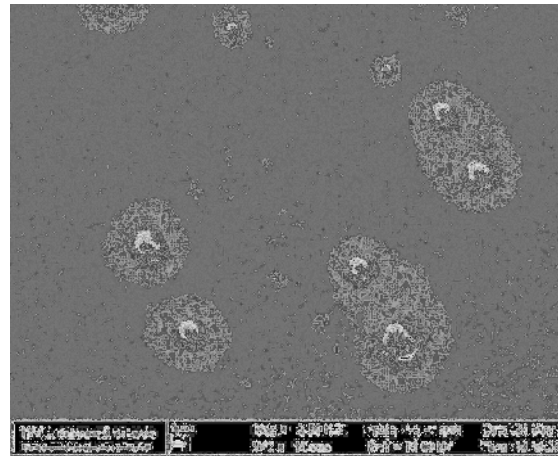
L. delbrueckii ss lactis DSMZ 20072, unverdaut



L. delbrueckii ss lactis DSMZ 20072, unverdaut



L. delbrueckii ss lactis DSMZ 20072, verdaut



L. delbrueckii ss lactis DSMZ 20072, verdaut

Abbildung 12: *L. delbrueckii* ss lactis DSMZ 20072 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

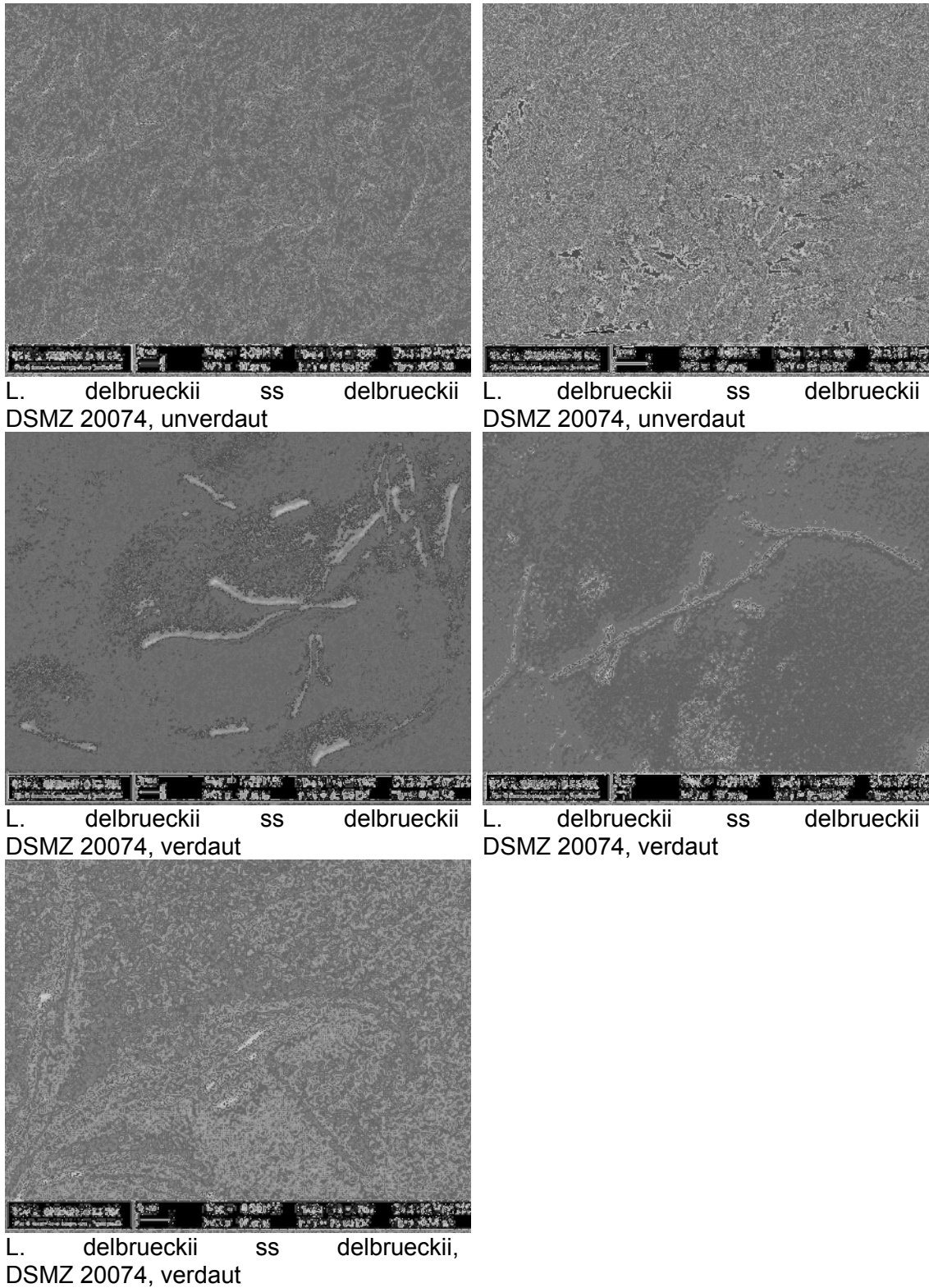
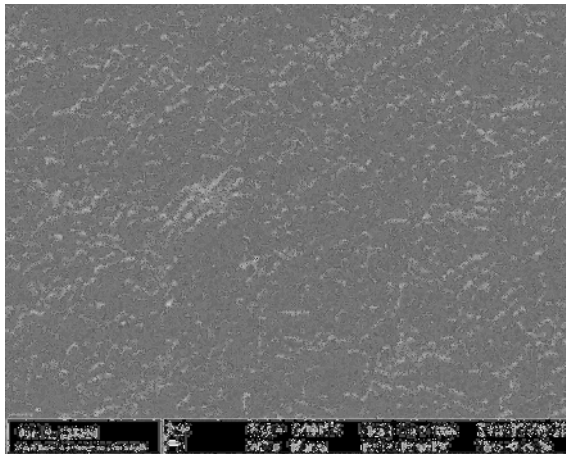
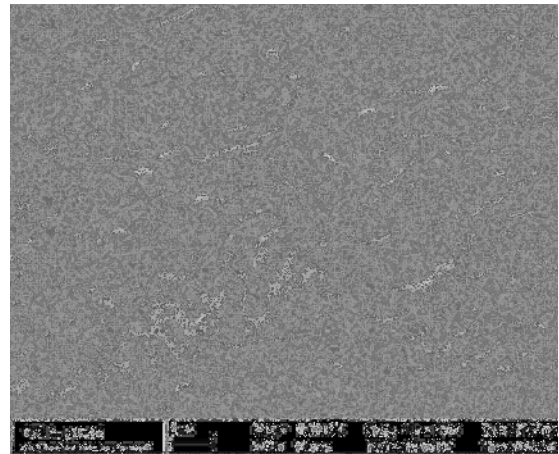


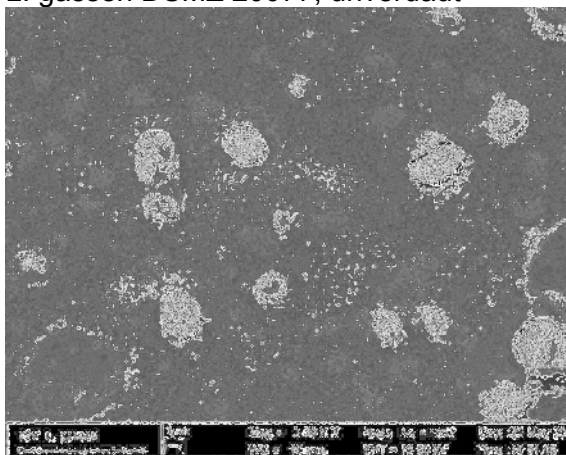
Abbildung 13: *L. delbrueckii* ss *delbrueckii* DSMZ 20074 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



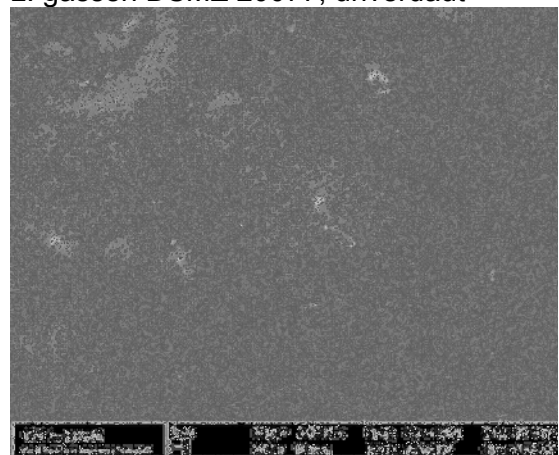
L. gasseri DSMZ 20077, unverdaut



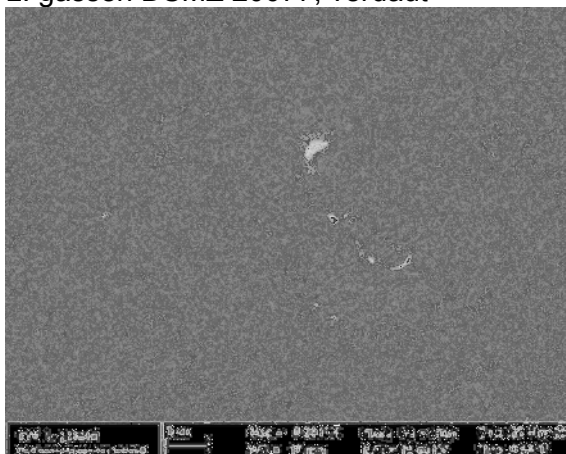
L. gasseri DSMZ 20077, unverdaut



L. gasseri DSMZ 20077, verdaut

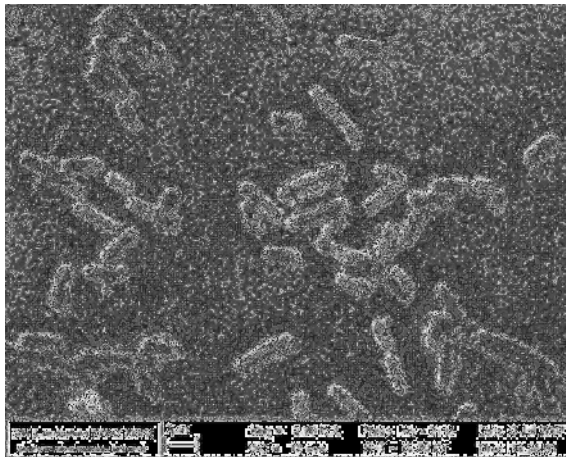


L. gasseri DSMZ 20077, verdaut

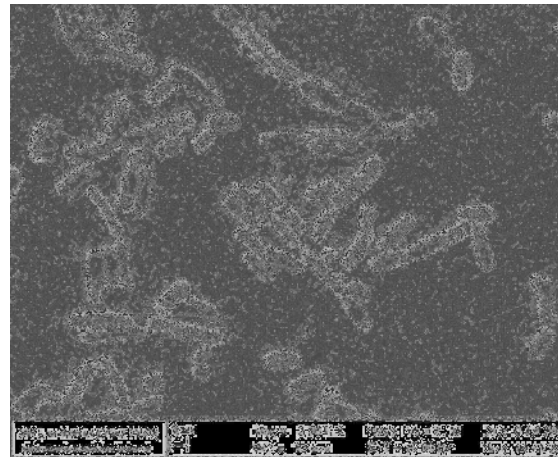


L. gasseri DSMZ 20077, verdaut

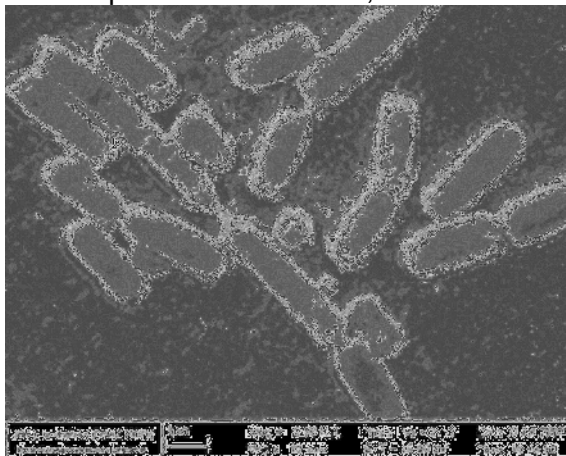
Abbildung 14: L. gasseri DSMZ 20077 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



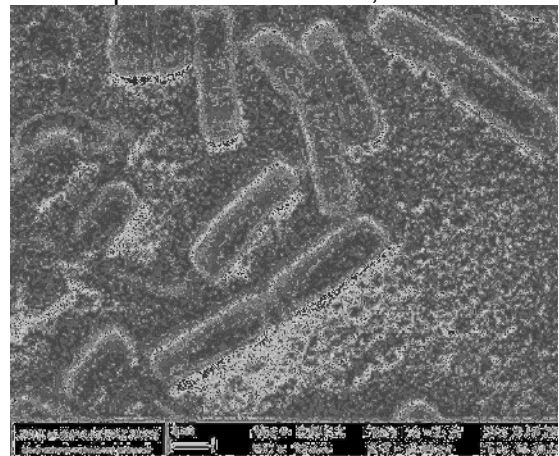
L. acidophilus DSMZ 20079, unverdaut



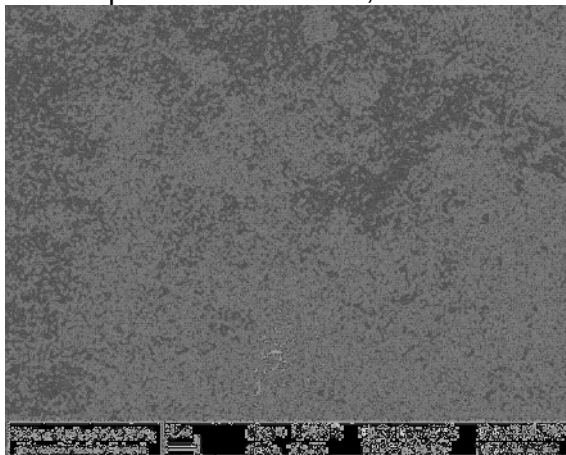
L. acidophilus DSMZ 20079, unverdaut



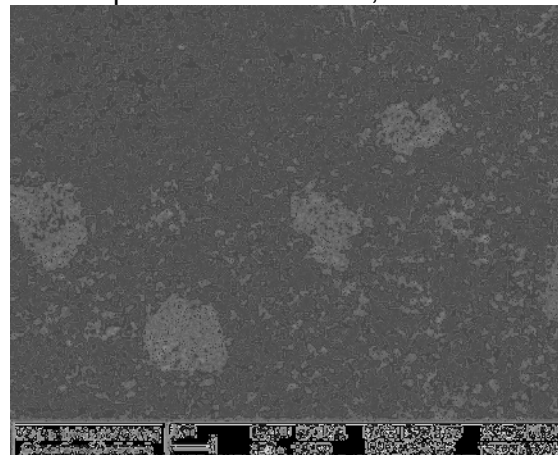
L. acidophilus DSMZ 20079, unverdaut



L. acidophilus DSMZ 20079, unverdaut



L. acidophilus DSMZ 20079, verdaut



L. acidophilus DSMZ 20079, verdaut

Abbildung 15: *L. acidophilus* DSMZ 20079 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

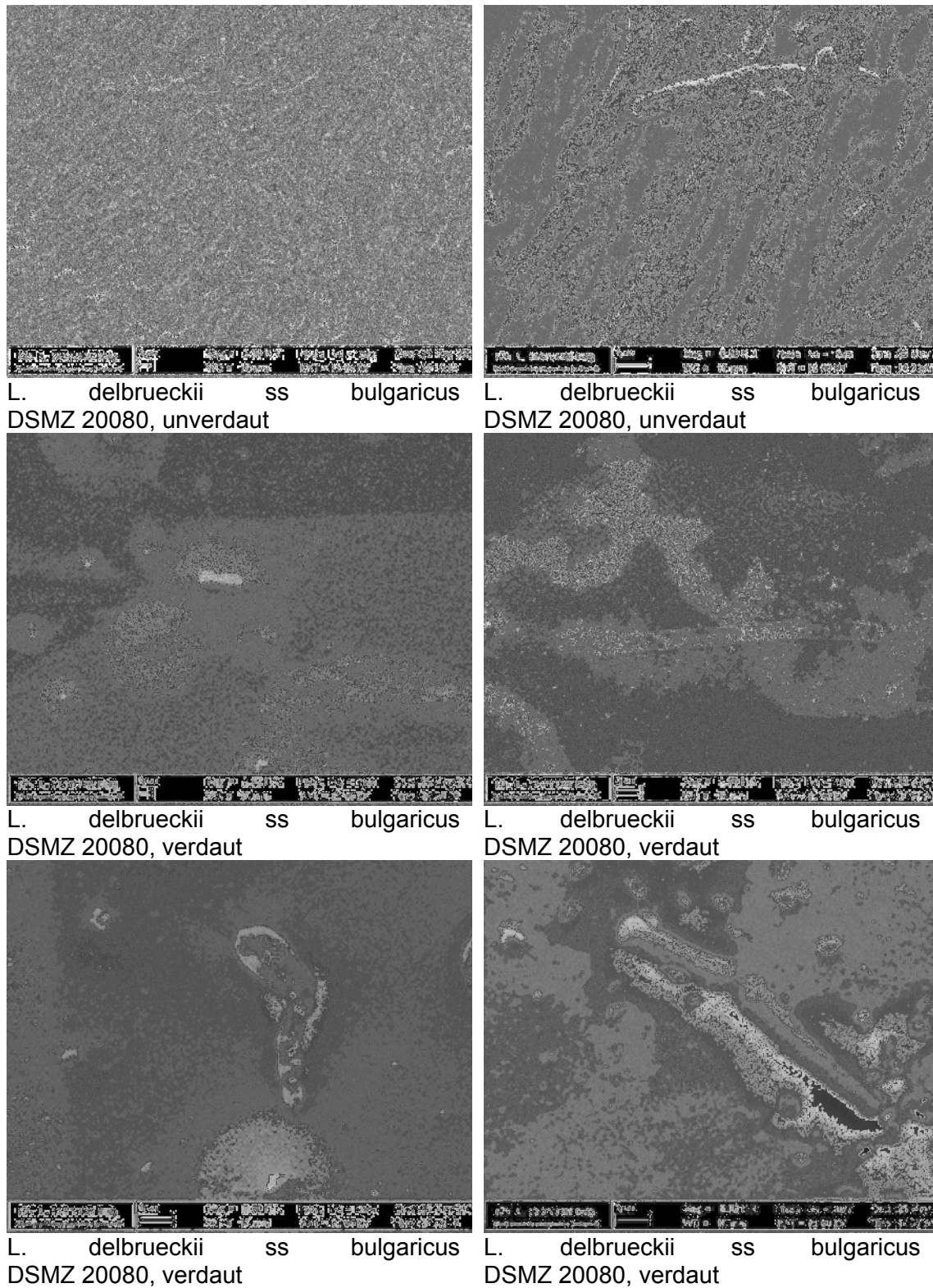
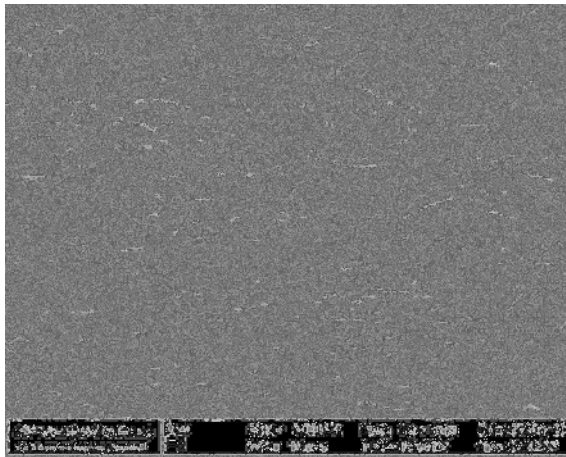
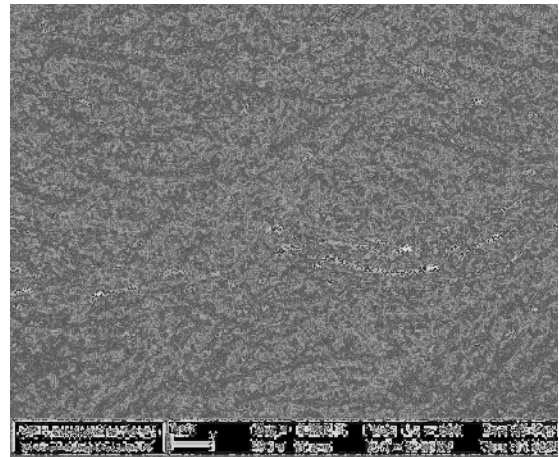


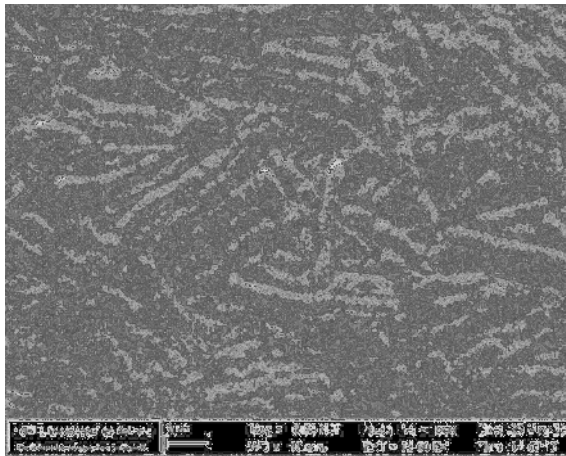
Abbildung 16: *L. delbrueckii* ss *bulgaricus* DSMZ 20080 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



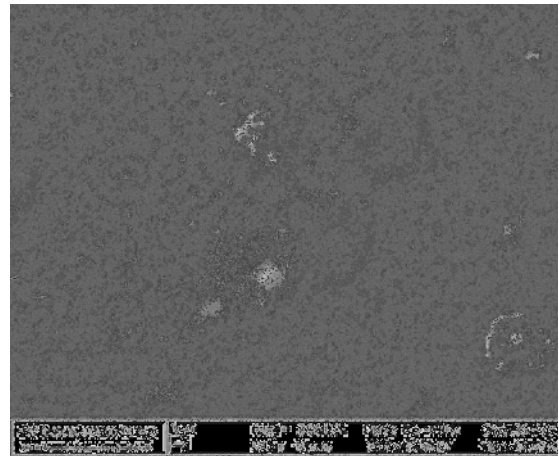
L. casei ss rhamnosus DSMZ 20178, unverdaut



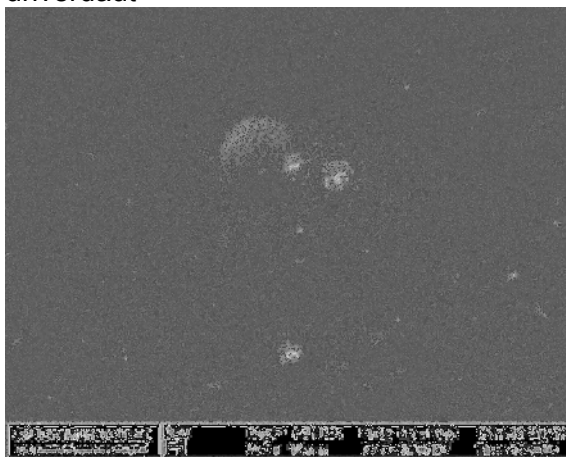
L. casei ss rhamnosus DSMZ 20178, unverdaut



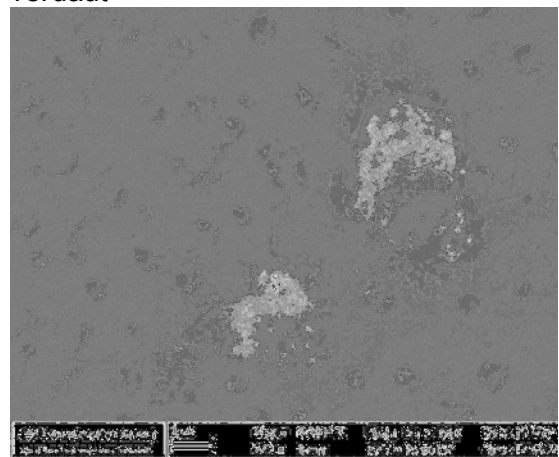
L. casei ss rhamnosus DSMZ 20178, unverdaut



L. casei ss rhamnosus DSMZ 20178, verdaut



L. casei ss rhamnosus DSMZ 20178, verdaut



L. casei ss rhamnosus DSMZ 20178, verdaut

Abbildung 17: L. casei ss rhamnosus DSMZ 20178 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

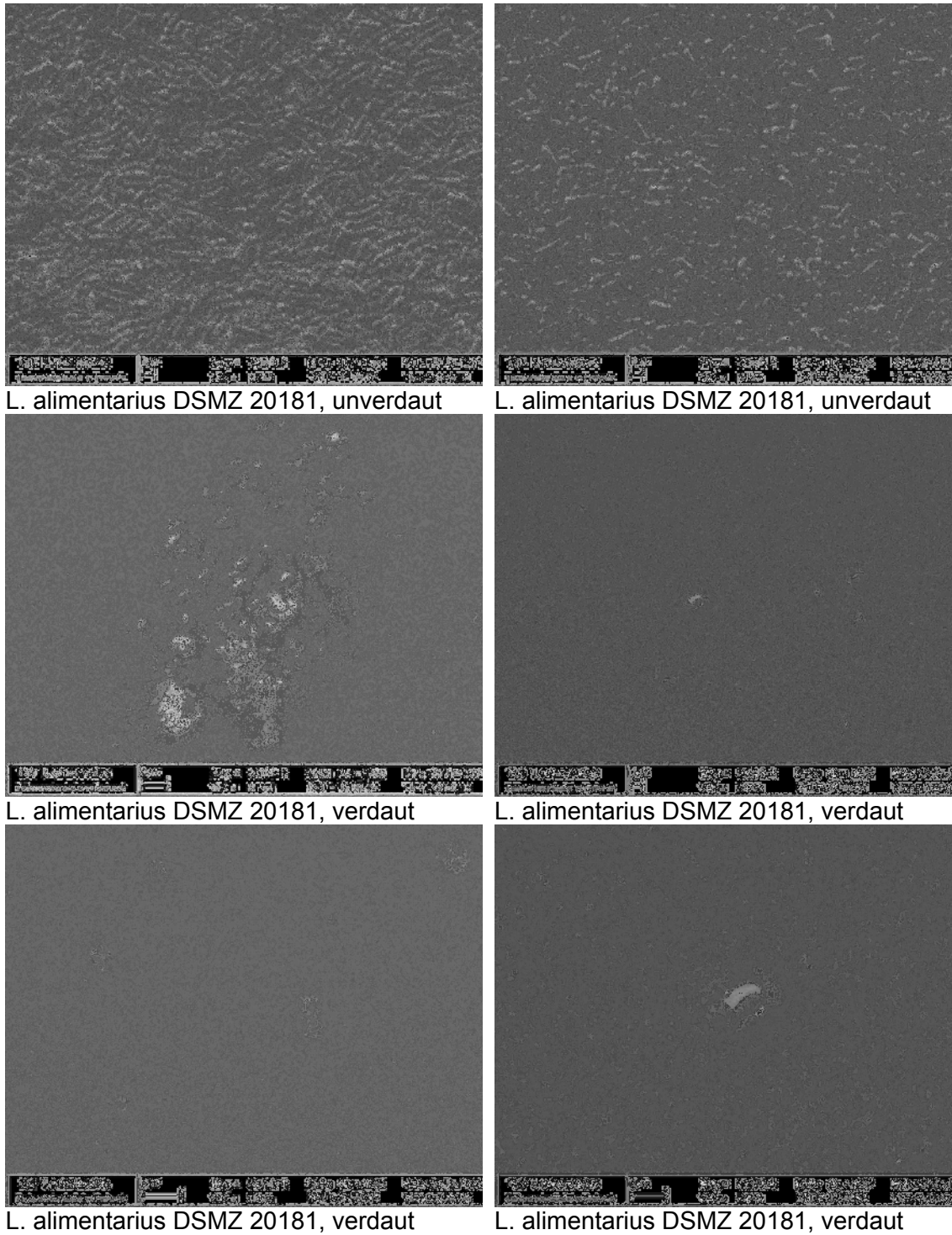
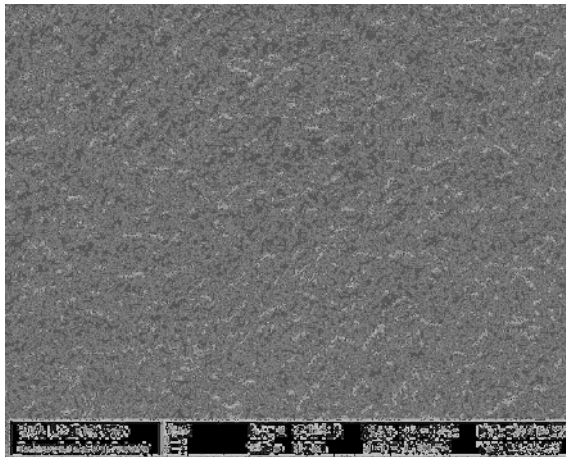
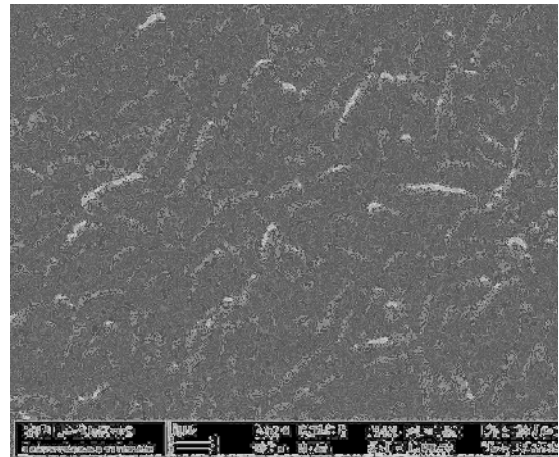


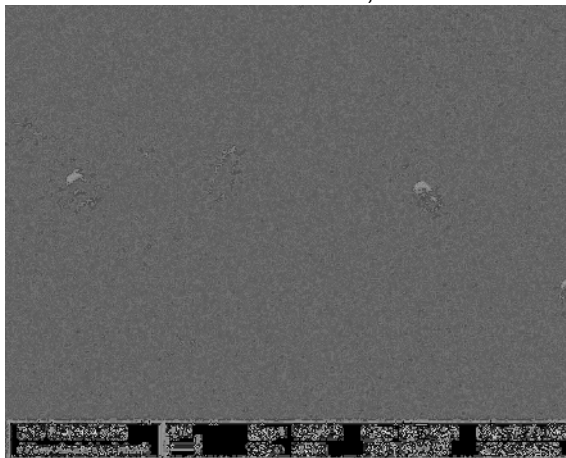
Abbildung 18: *L. alimentarius* DSMZ 20181 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



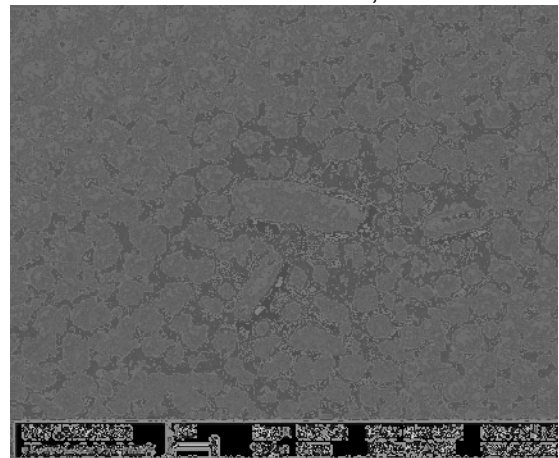
L. viridescens DSMZ 20410, unverdaut



L. viridescens DSMZ 20410, unverdaut

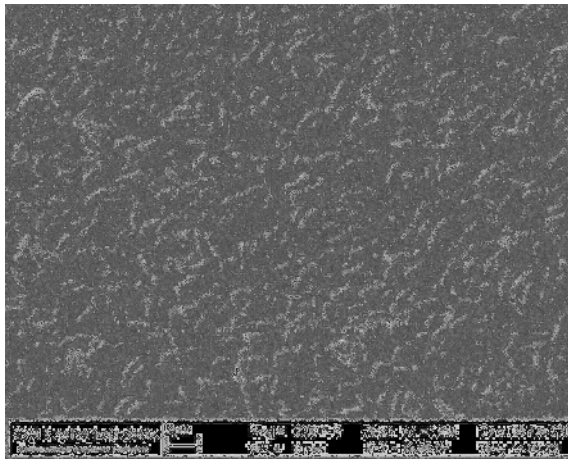


L. viridescens DSMZ 20410, verdaut

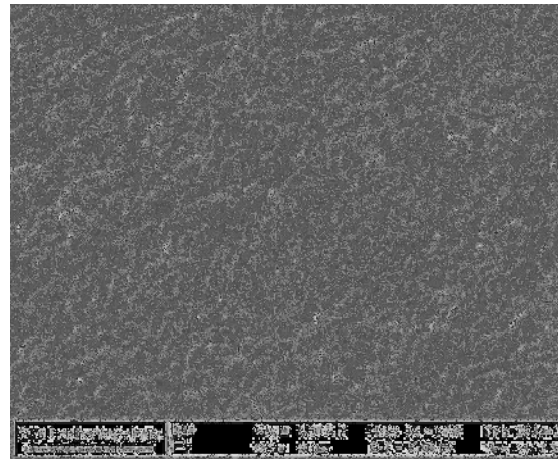


L. viridescens DSMZ 20410, verdaut

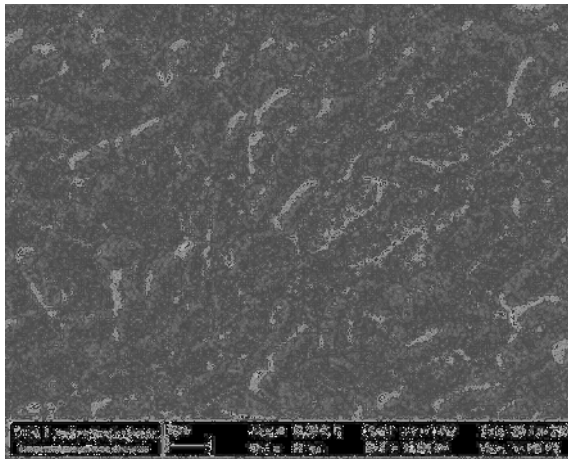
Abbildung 19: *L. viridescens* DSMZ 20410 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



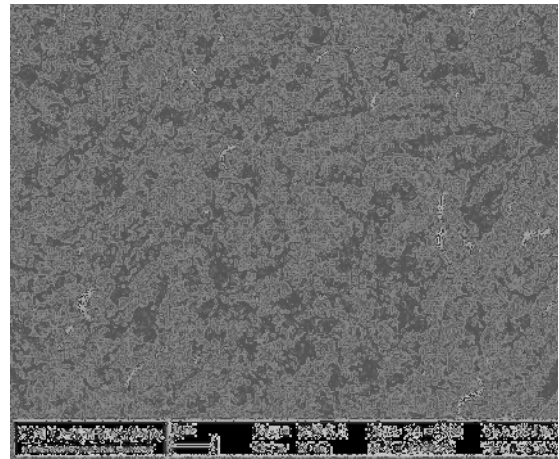
L. salivarius ss salivarius DSMZ 20555, unverdaut



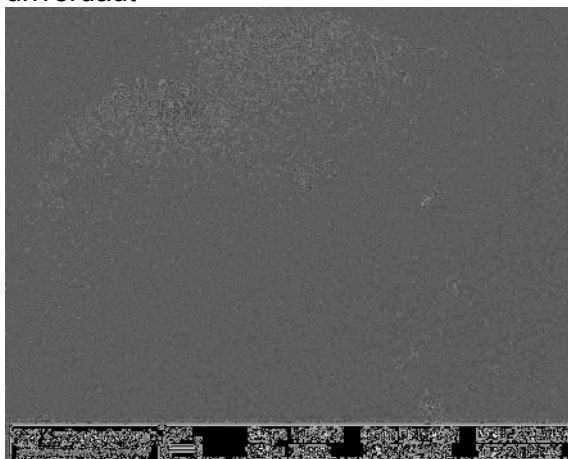
L. salivarius ss salivarius DSMZ 20555, unverdaut



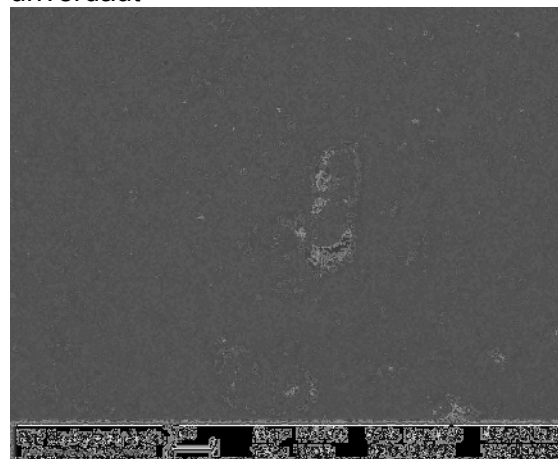
L. salivarius ss salivarius DSMZ 20555, unverdaut



L. salivarius ss salivarius DSMZ 20555, unverdaut



L. salivarius ss salivarius DSMZ 20555, verdaut



L. salivarius ss salivarius DSMZ 20555, verdaut

Abbildung 20: L. salivarius ss salivarius DSMZ 20555 nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

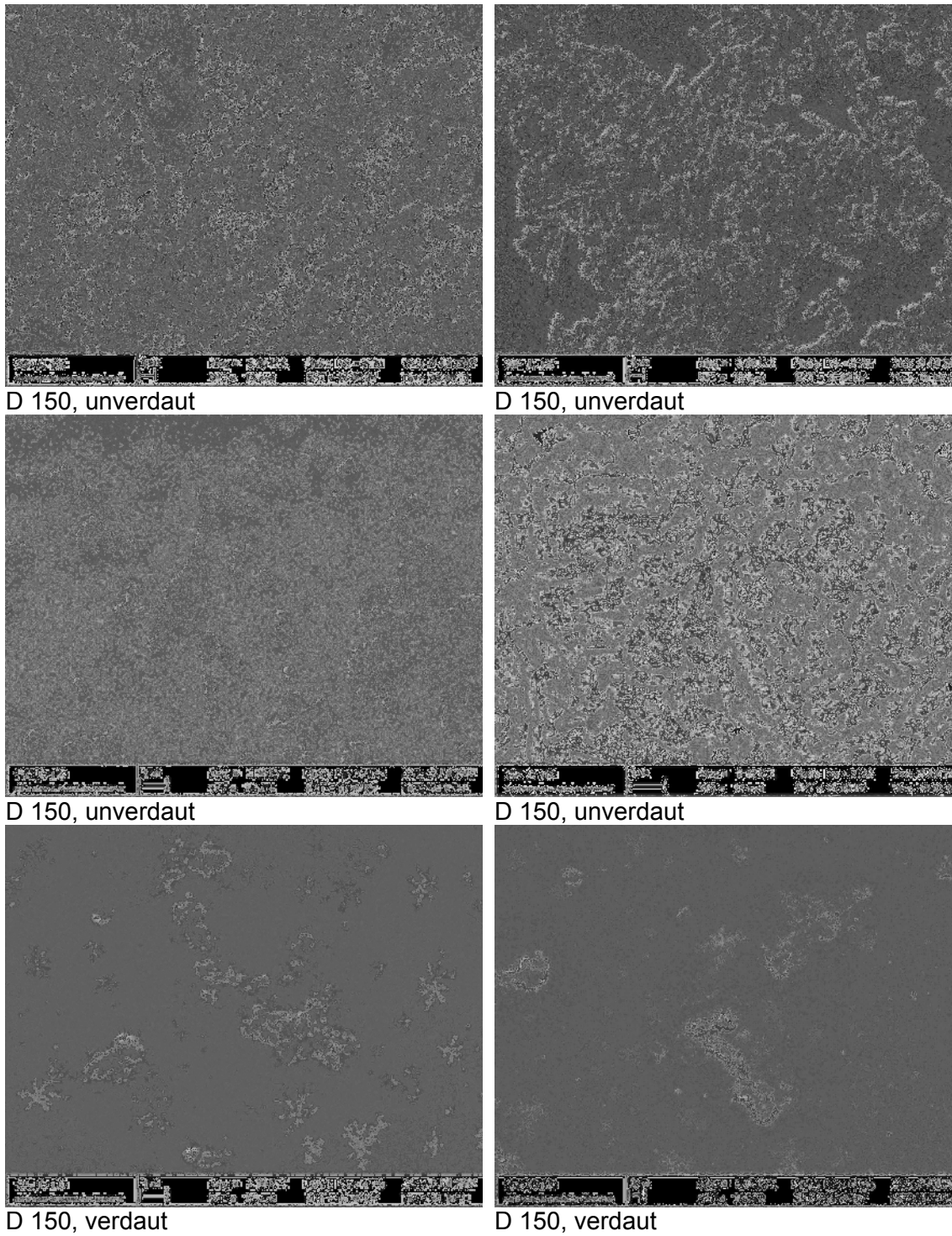
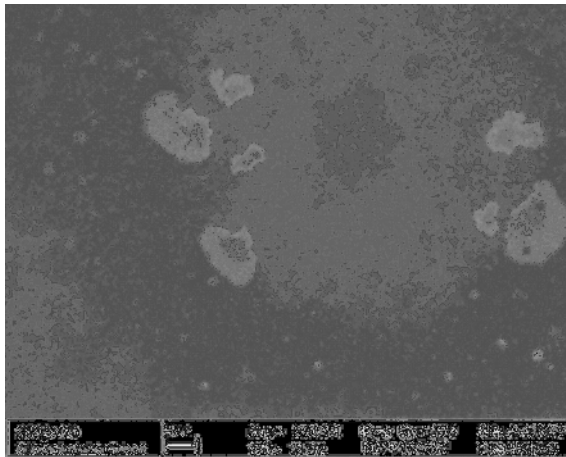
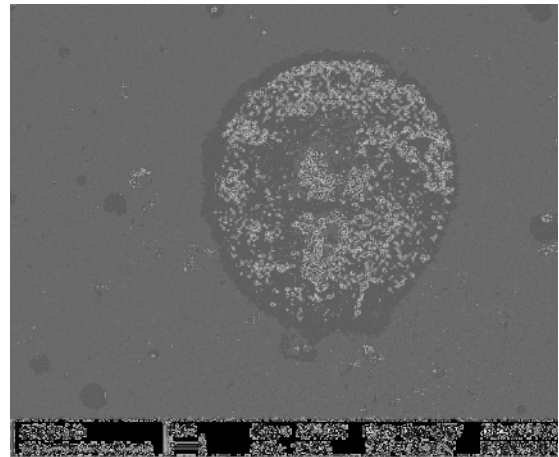


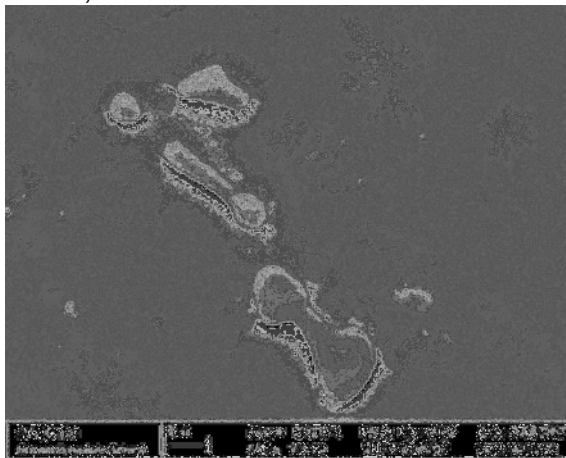
Abbildung 21: D 150 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



D 150, verdaut



D 150, verdaut



D 150, verdaut

Abbildung 21a: D 150 nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

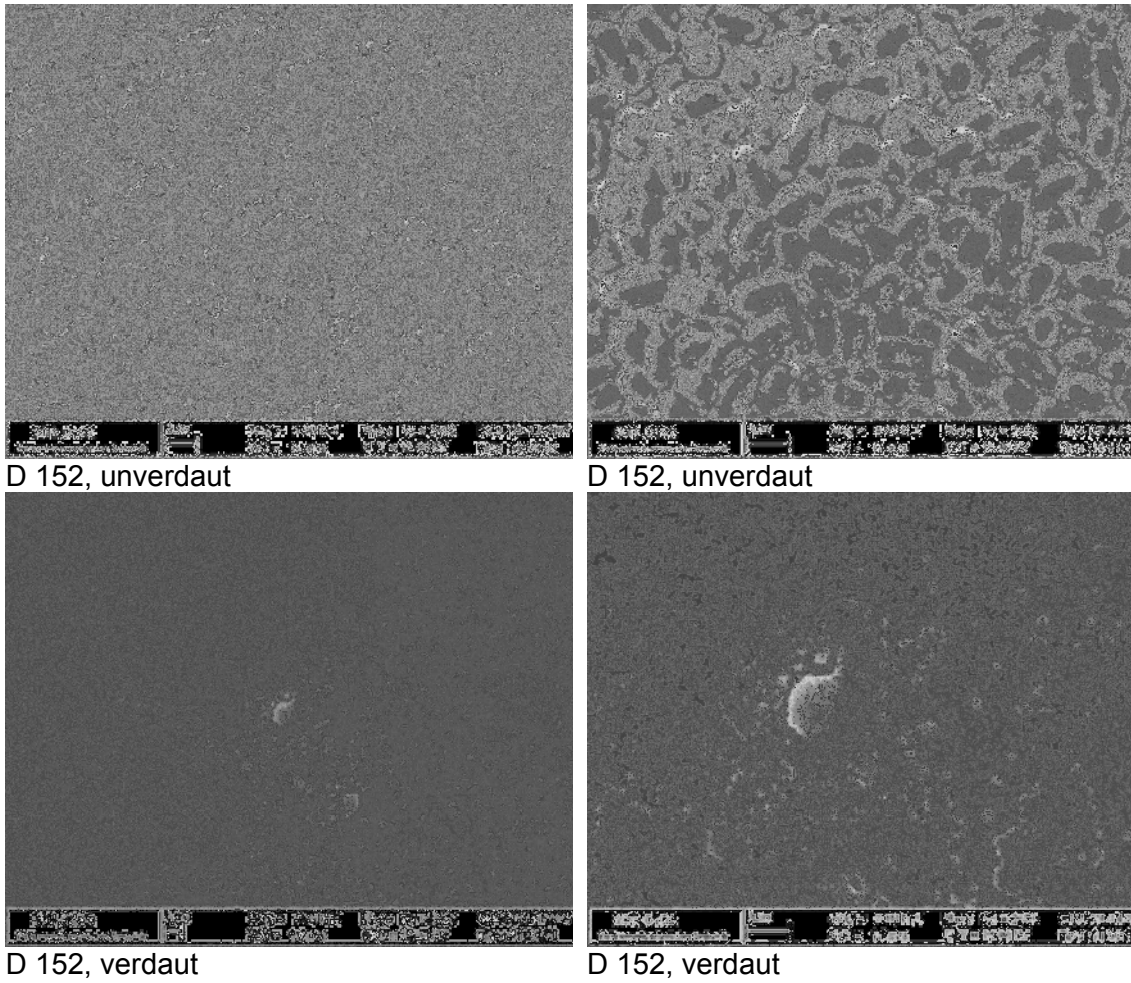
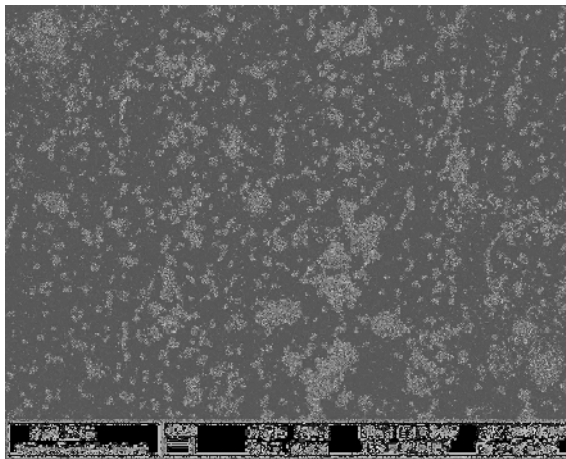
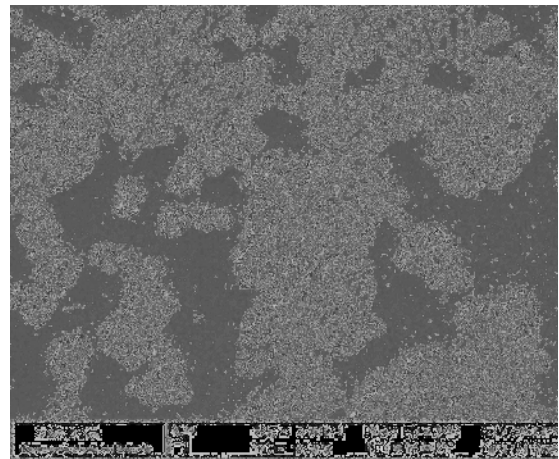


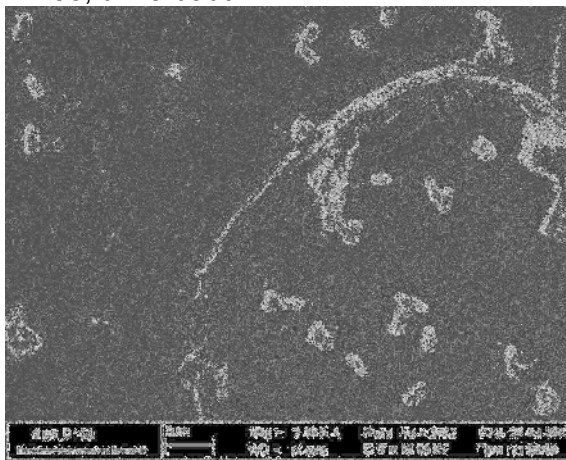
Abbildung 22: D 152 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



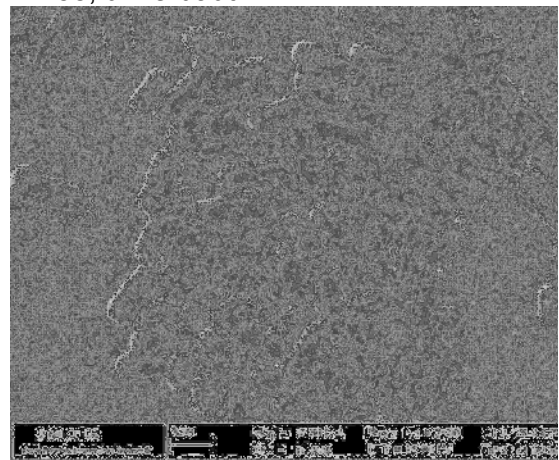
D 158, unverdaut



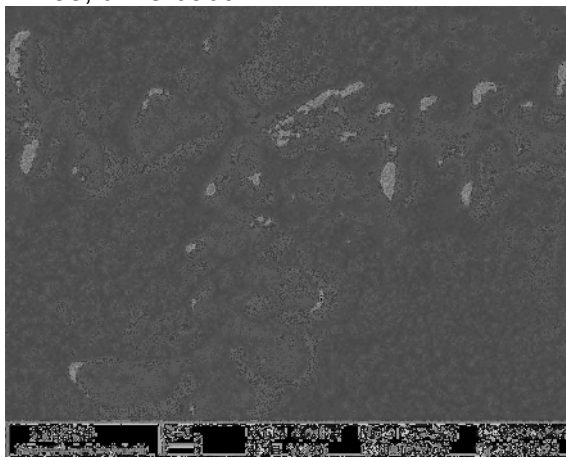
D 158, unverdaut



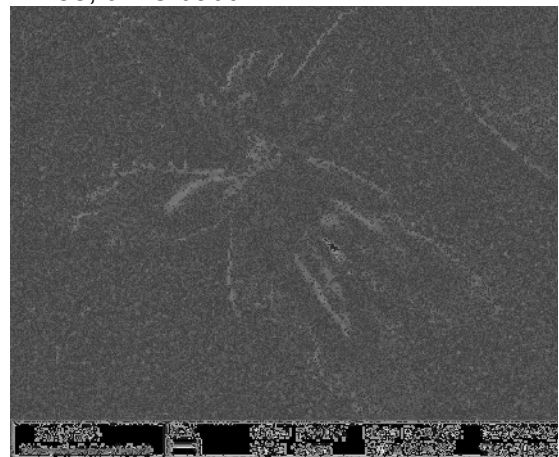
D 158, unverdaut



D 158, unverdaut

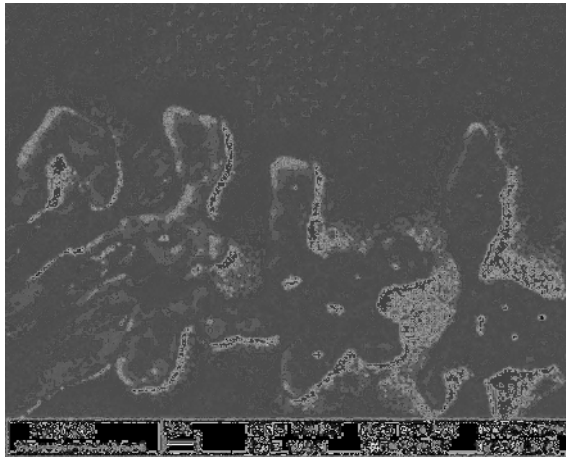


D 158, verdaut

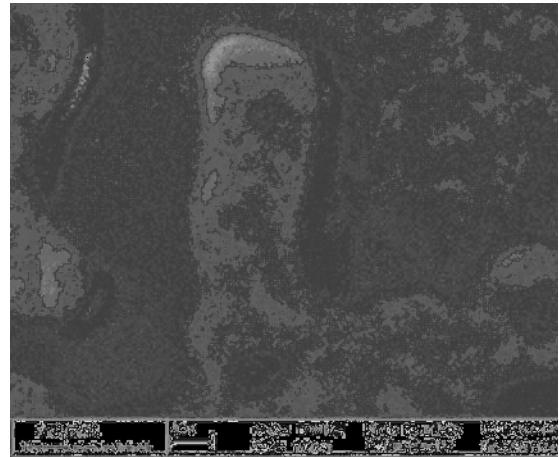


D 158, verdaut

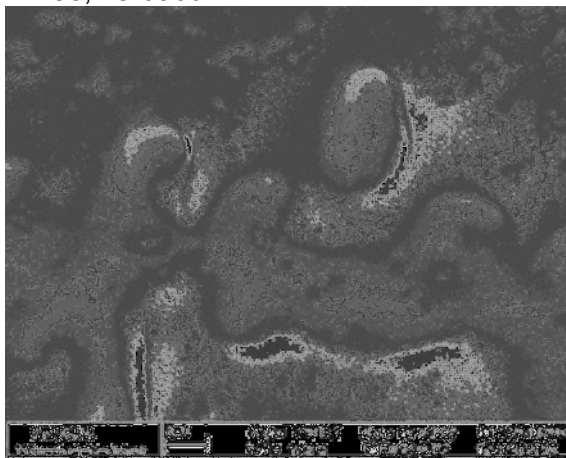
Abbildung 23: D 158 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 500- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



D 158, verdaut



D 158, verdaut



D 158, verdaut

Abbildung 23a: D 158 nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

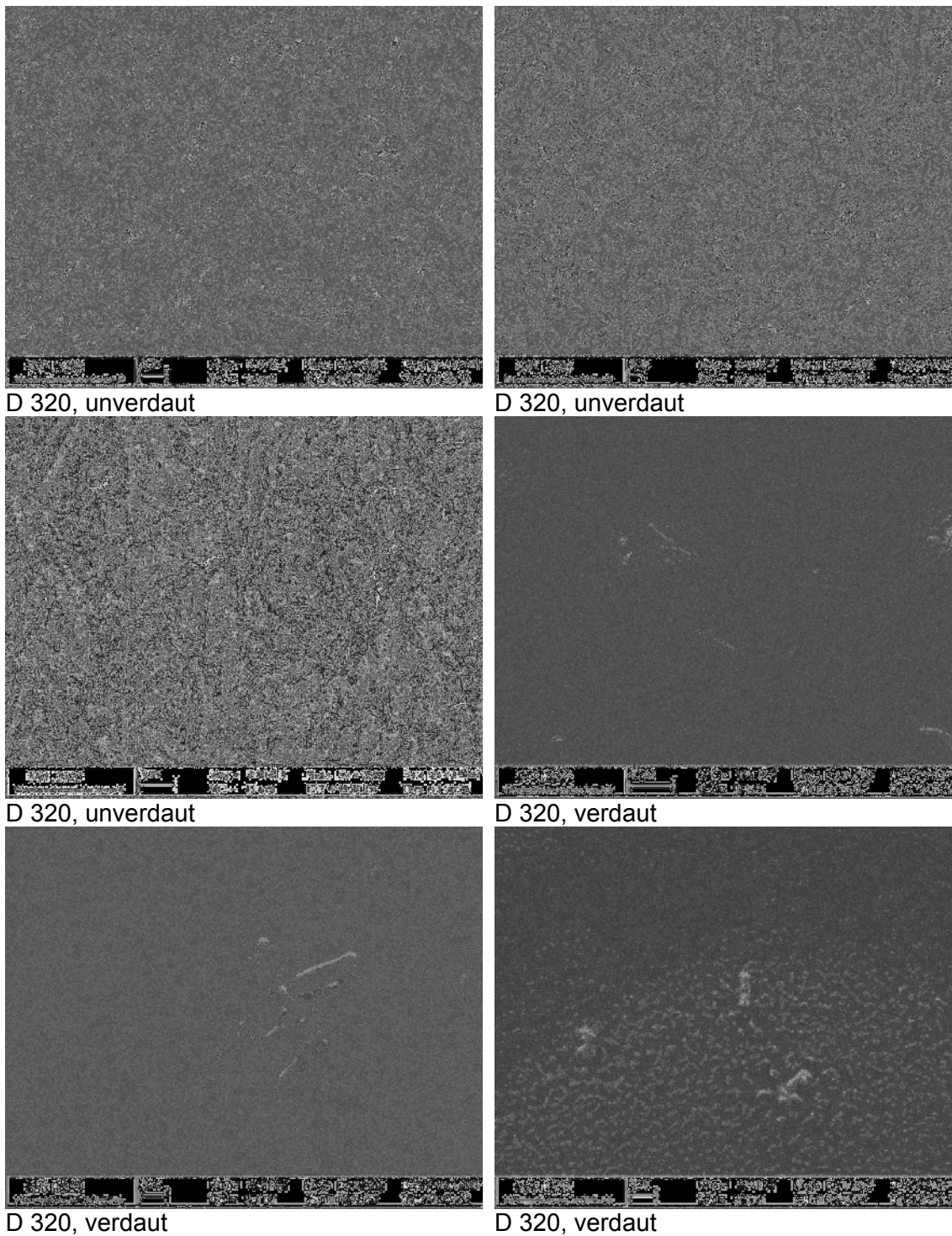
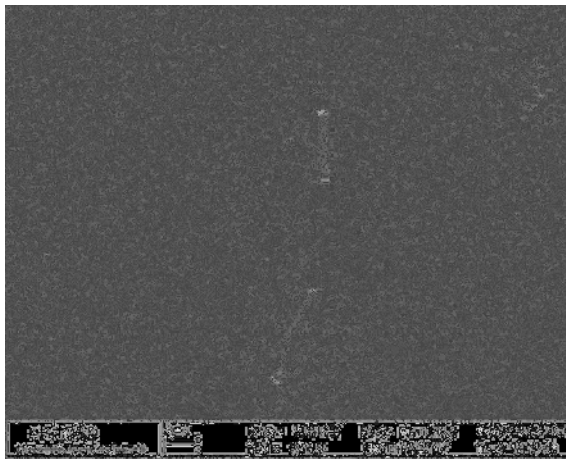
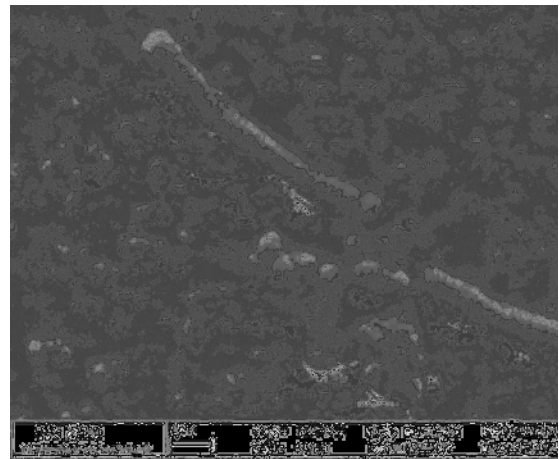


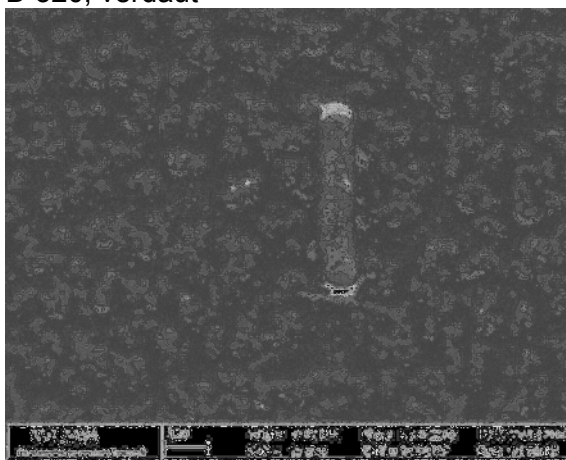
Abbildung 24: D 320 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



D 320, verdaut



D 320, verdaut



D 320, verdaut

Abbildung 24a: D 320 nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

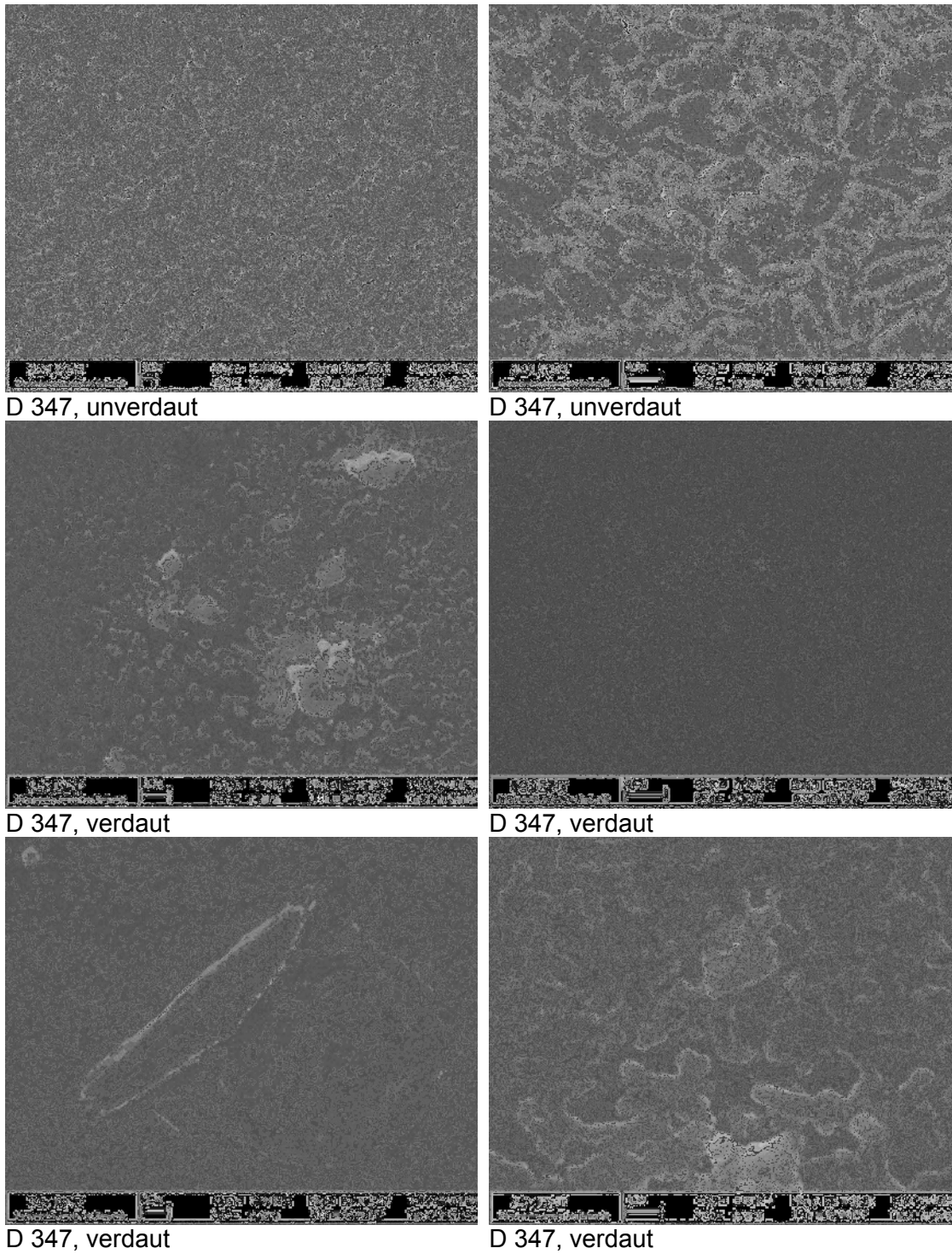


Abbildung 25: D 347 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

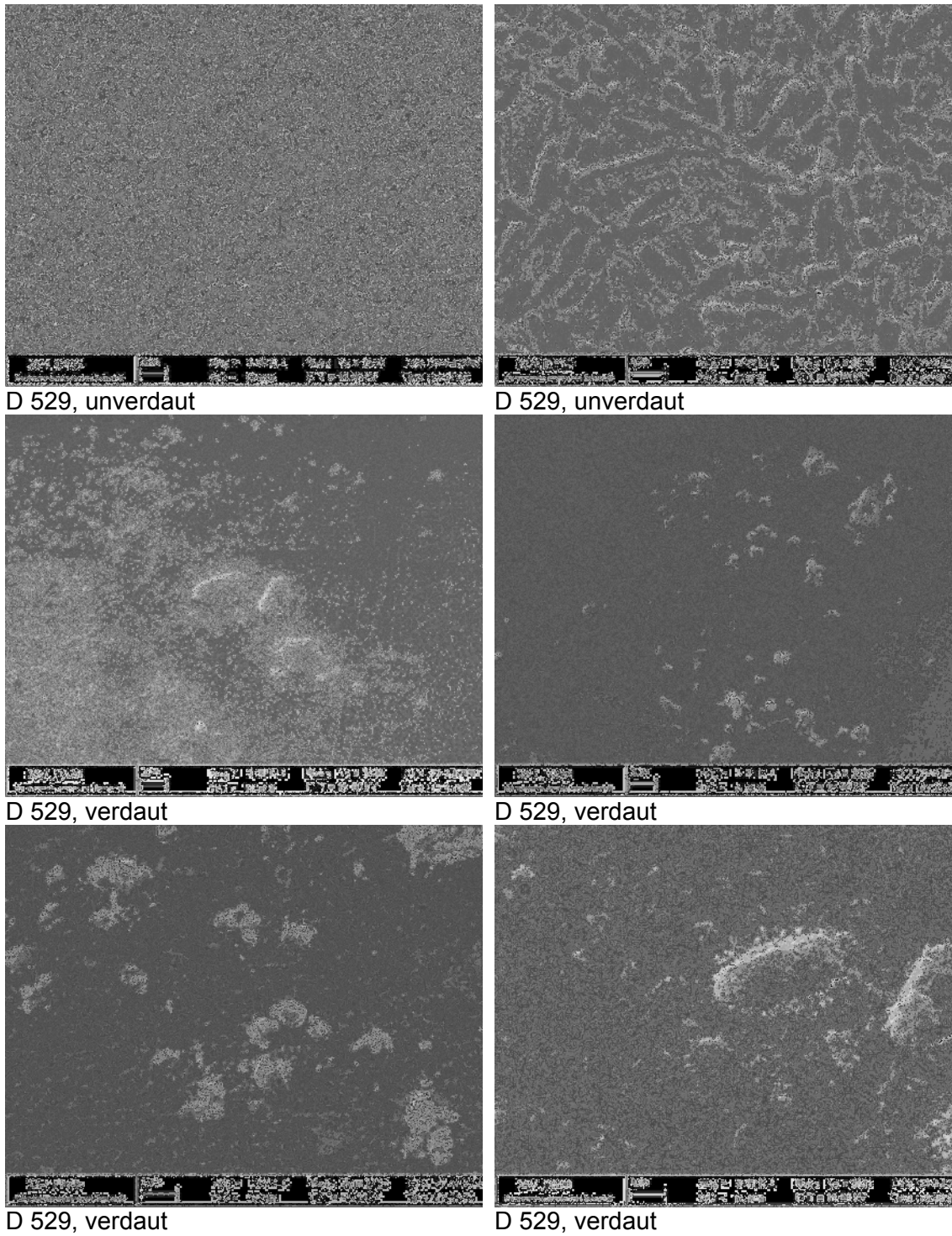


Abbildung 26: D 529 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

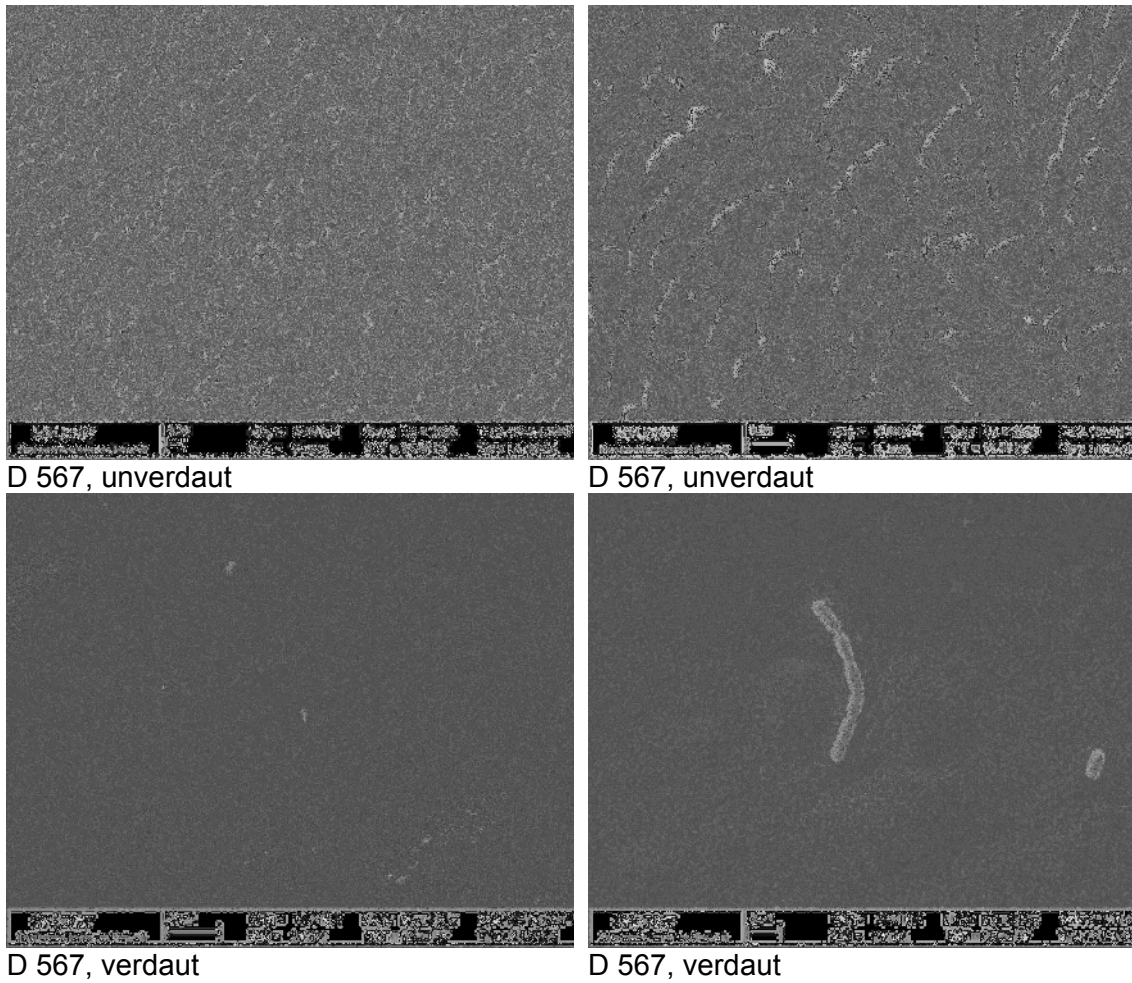
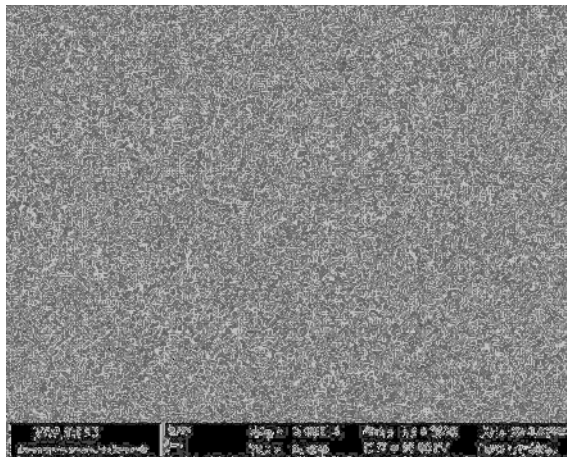
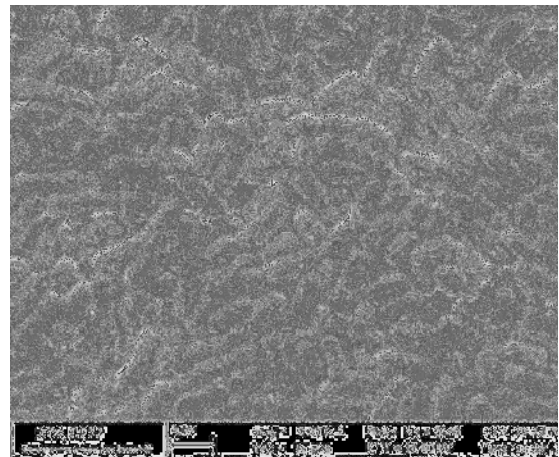


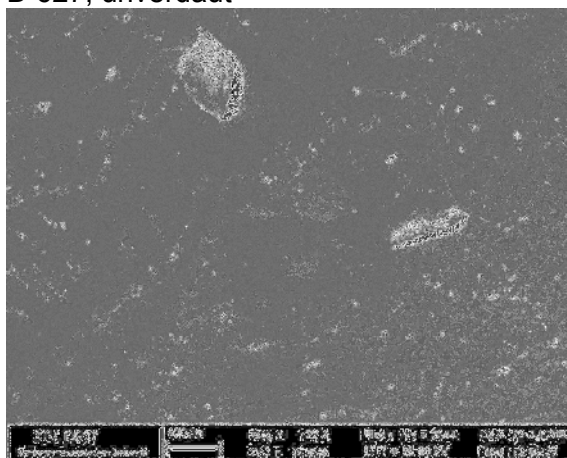
Abbildung 27: D 567 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



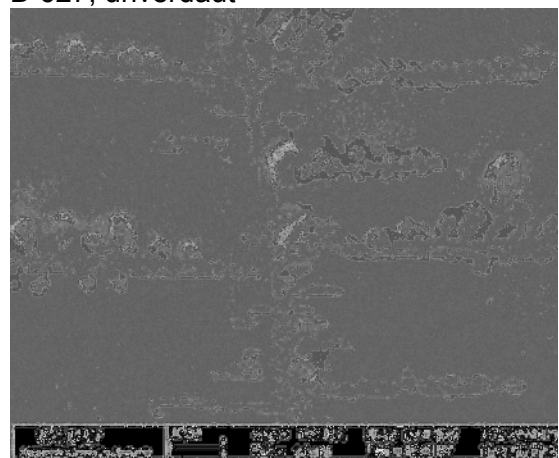
D 627, unverdaut



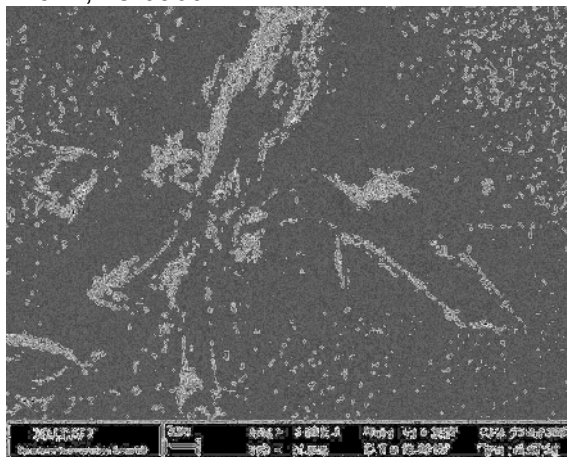
D 627, unverdaut



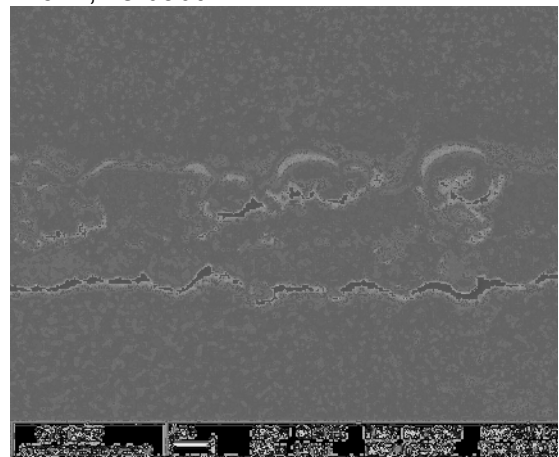
D 627, verdaut



D 627, verdaut

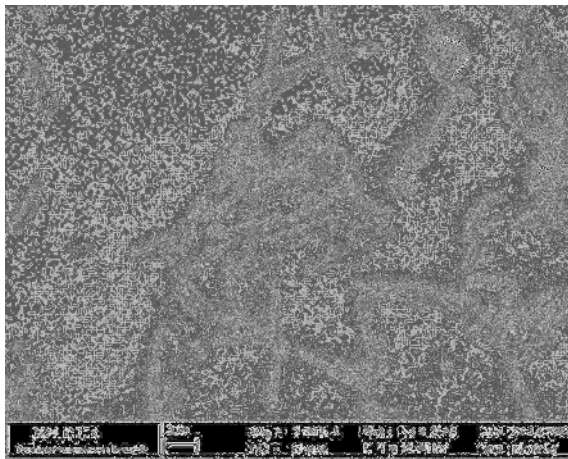


D 627, verdaut

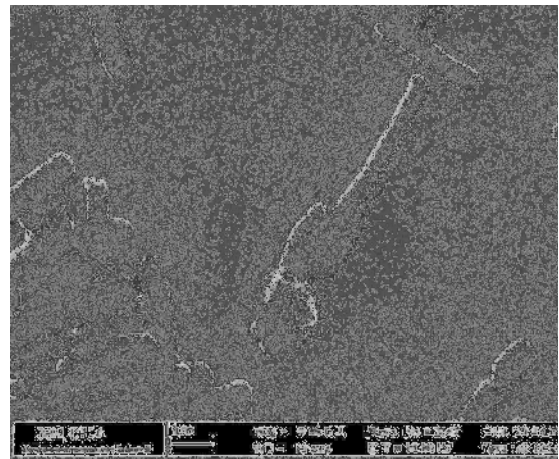


D 627, verdaut

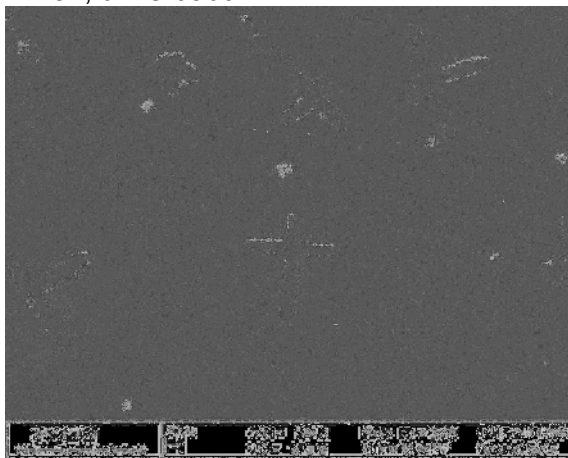
Abbildung 28: D 627 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 100- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



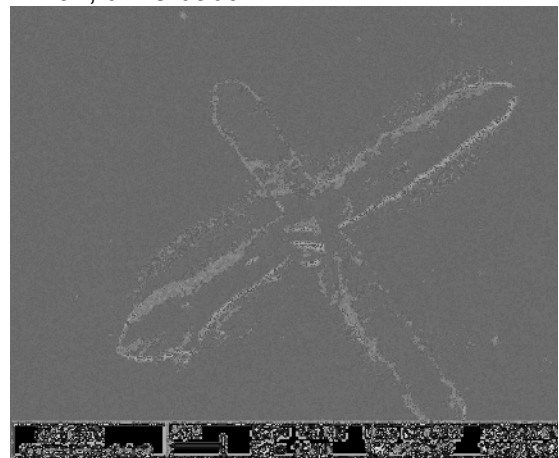
D 704, unverdaut



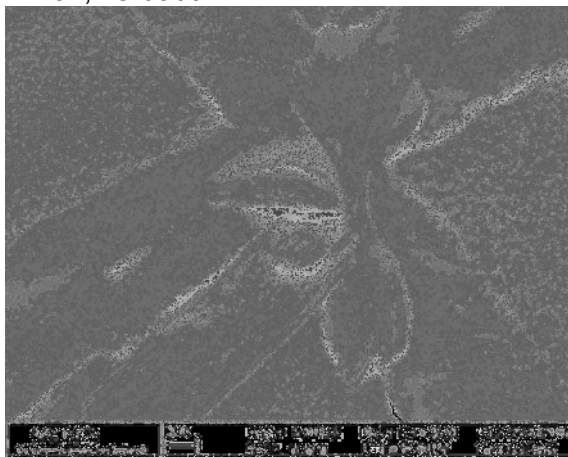
D 704, unverdaut



D 704, vertaut



D 704, vertaut



D 704, vertaut

Abbildung 29: D 704 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 300- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

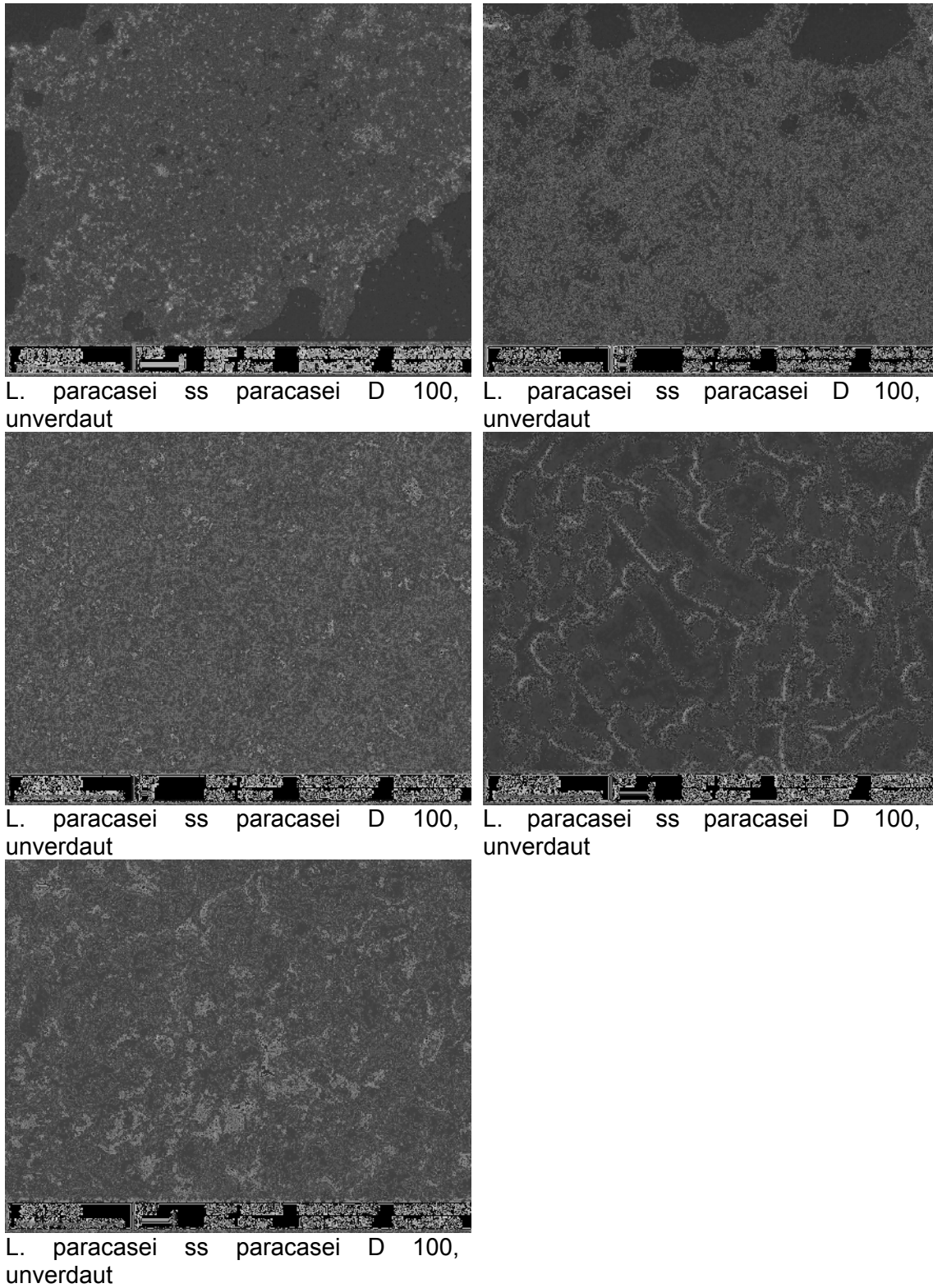


Abbildung 30: *L. paracasei* ss *paracasei* D 100 vor enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

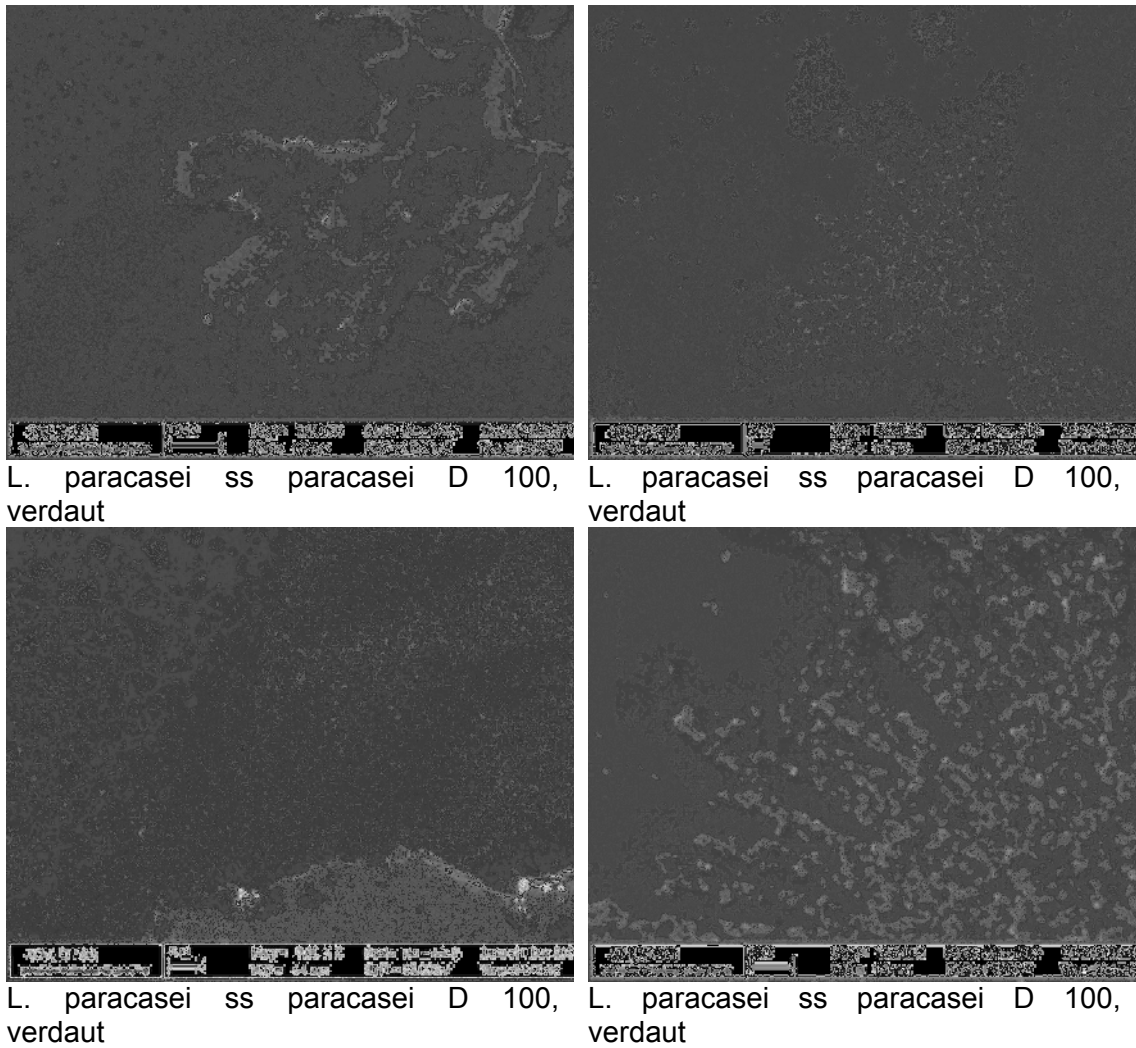


Abbildung 30a: L. paracasei ss paracasei D 100 nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

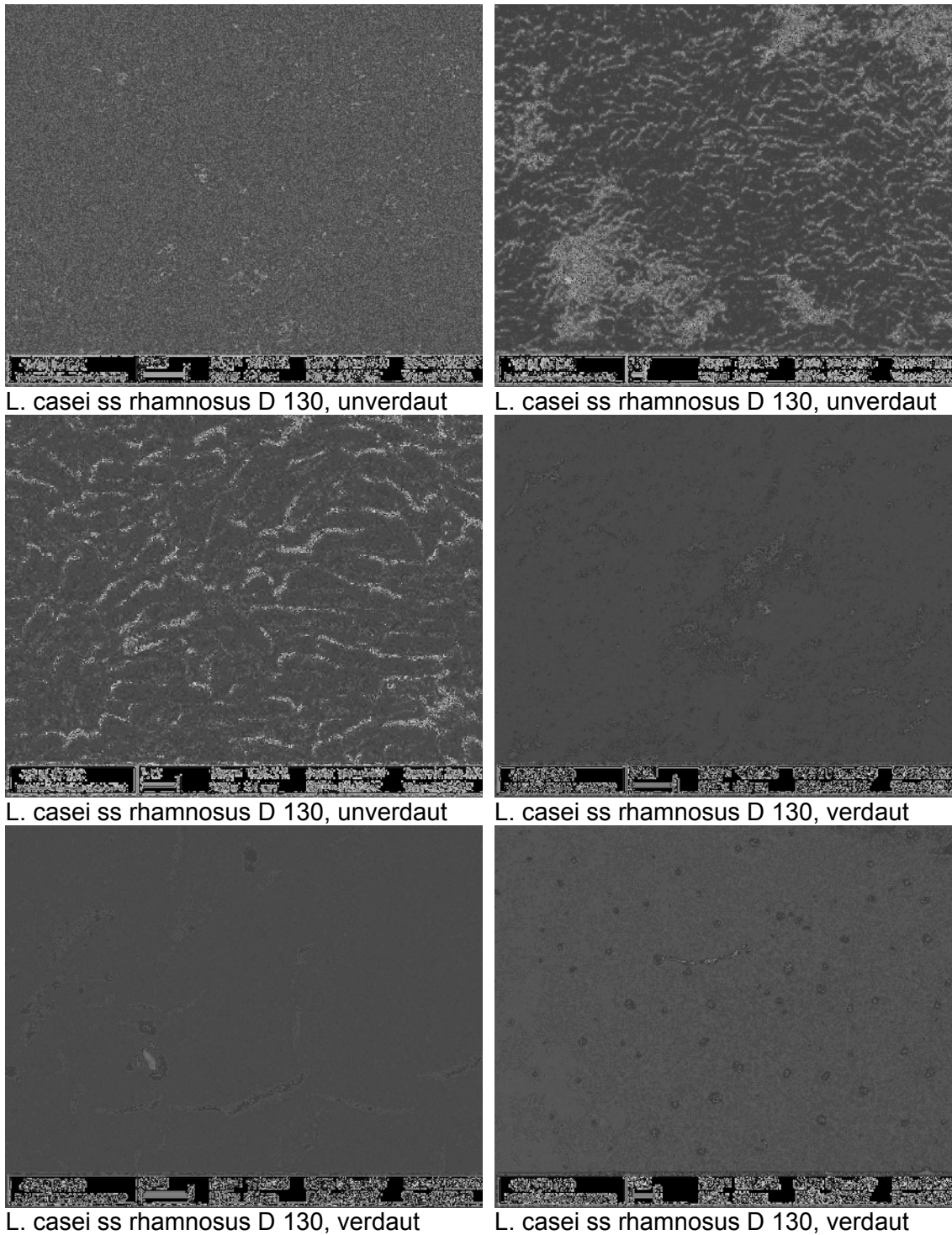


Abbildung 31: *L. casei* ss rhamnosus D 130 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

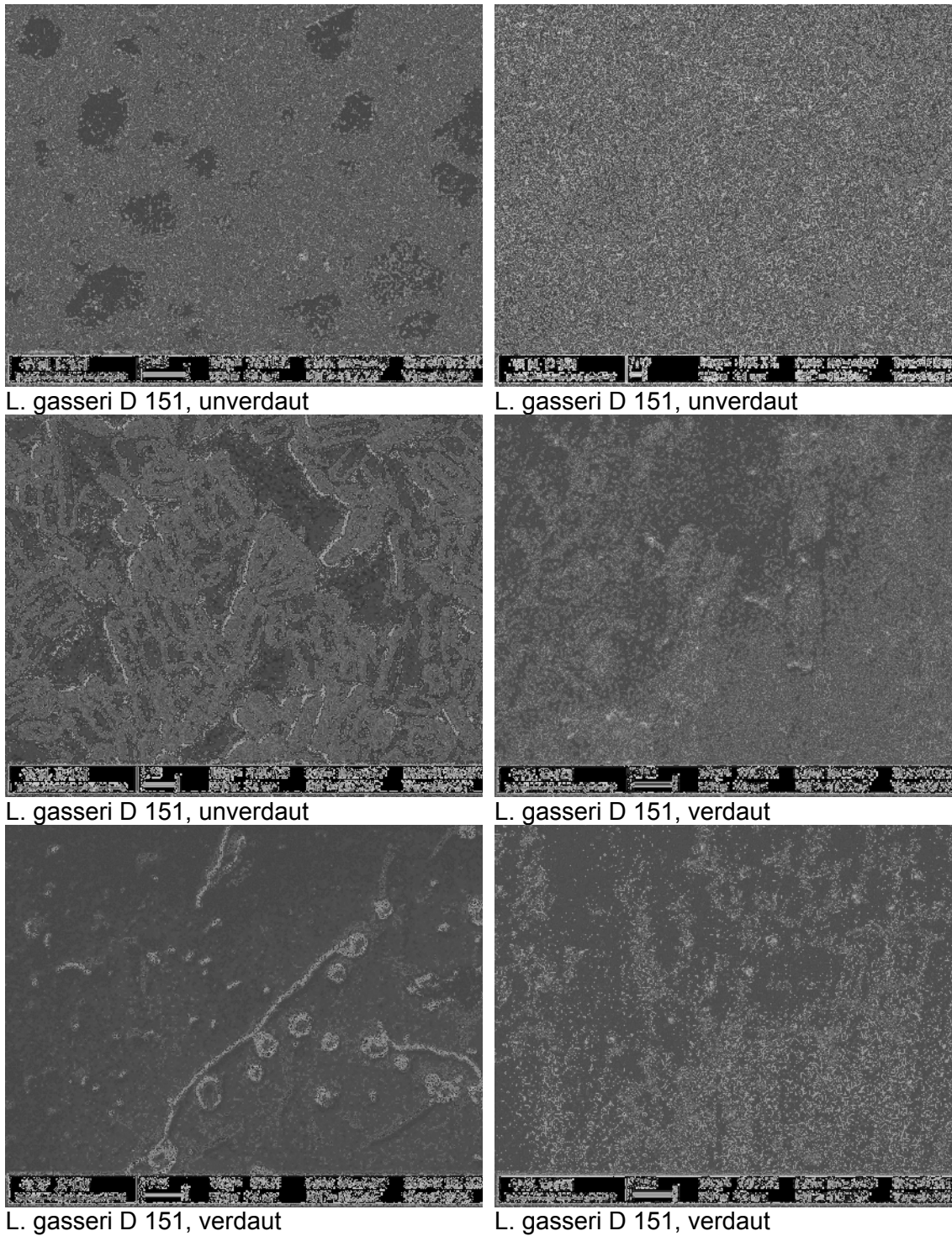
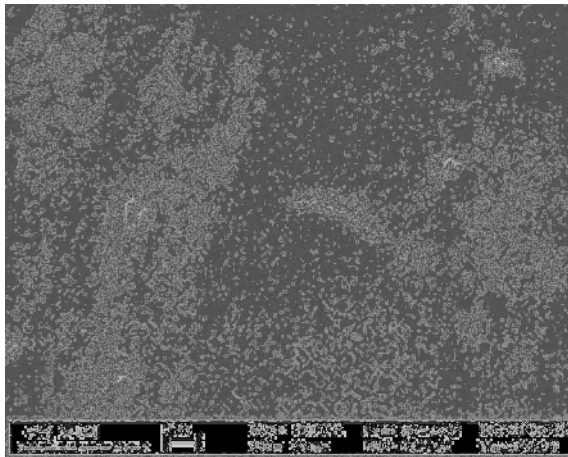
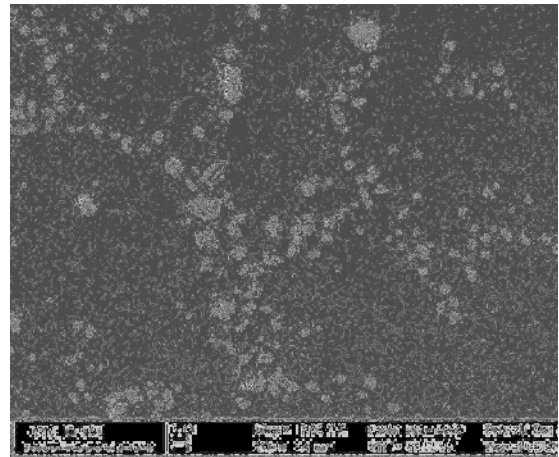


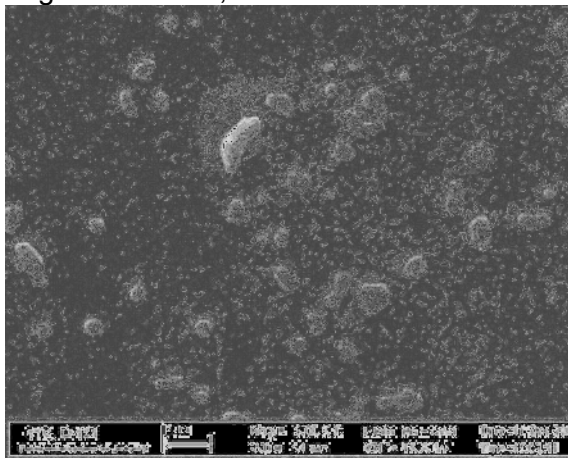
Abbildung 32: *L. gasseri* D 151 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



L. gasseri D 151, verdaut

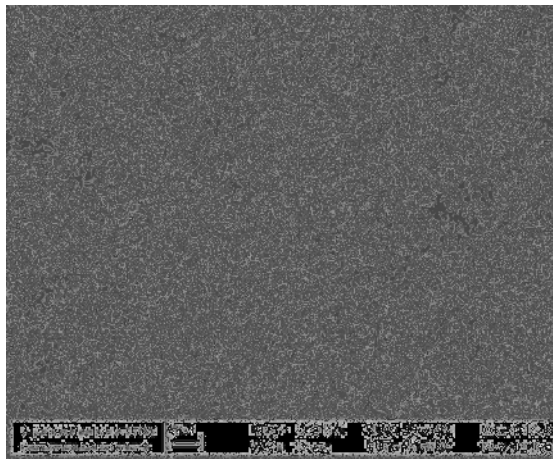


L. gasseri D 151, verdaut

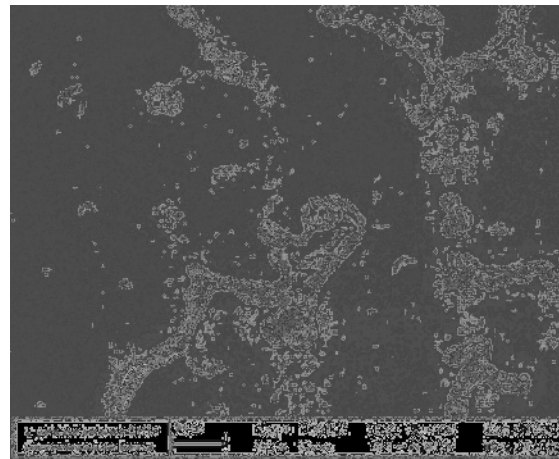


L. gasseri D 151, verdaut

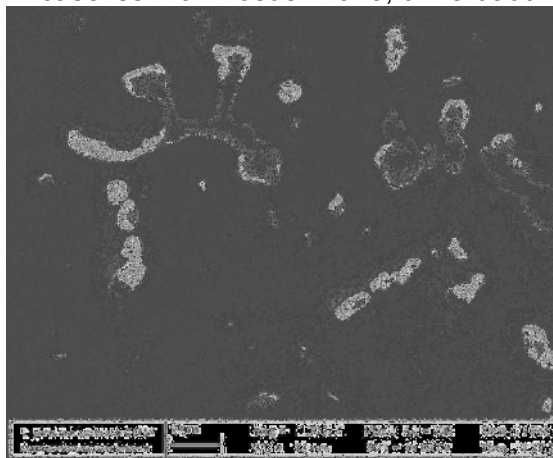
Abbildung 32a: L. gasseri D 151 nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



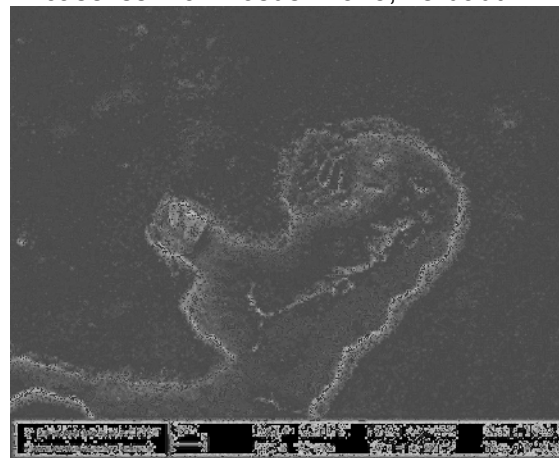
L. casei ss rhamnosus D 375, unverdaut



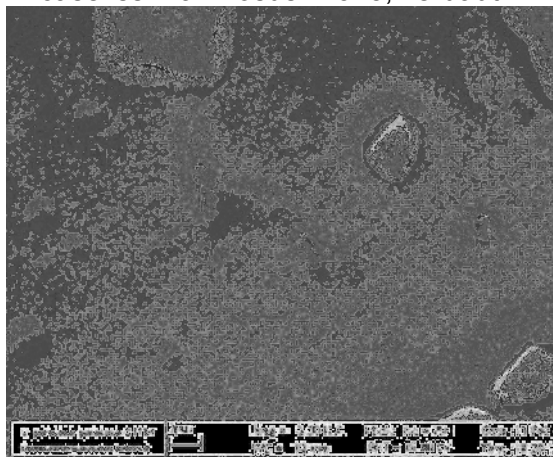
L. casei ss rhamnosus D 375, verdaut



L. casei ss rhamnosus D 375, verdaut



L. casei ss rhamnosus D 375, verdaut



L. casei ss rhamnosus D 375, verdaut

Abbildung 33: D 375 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- sowie 3000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

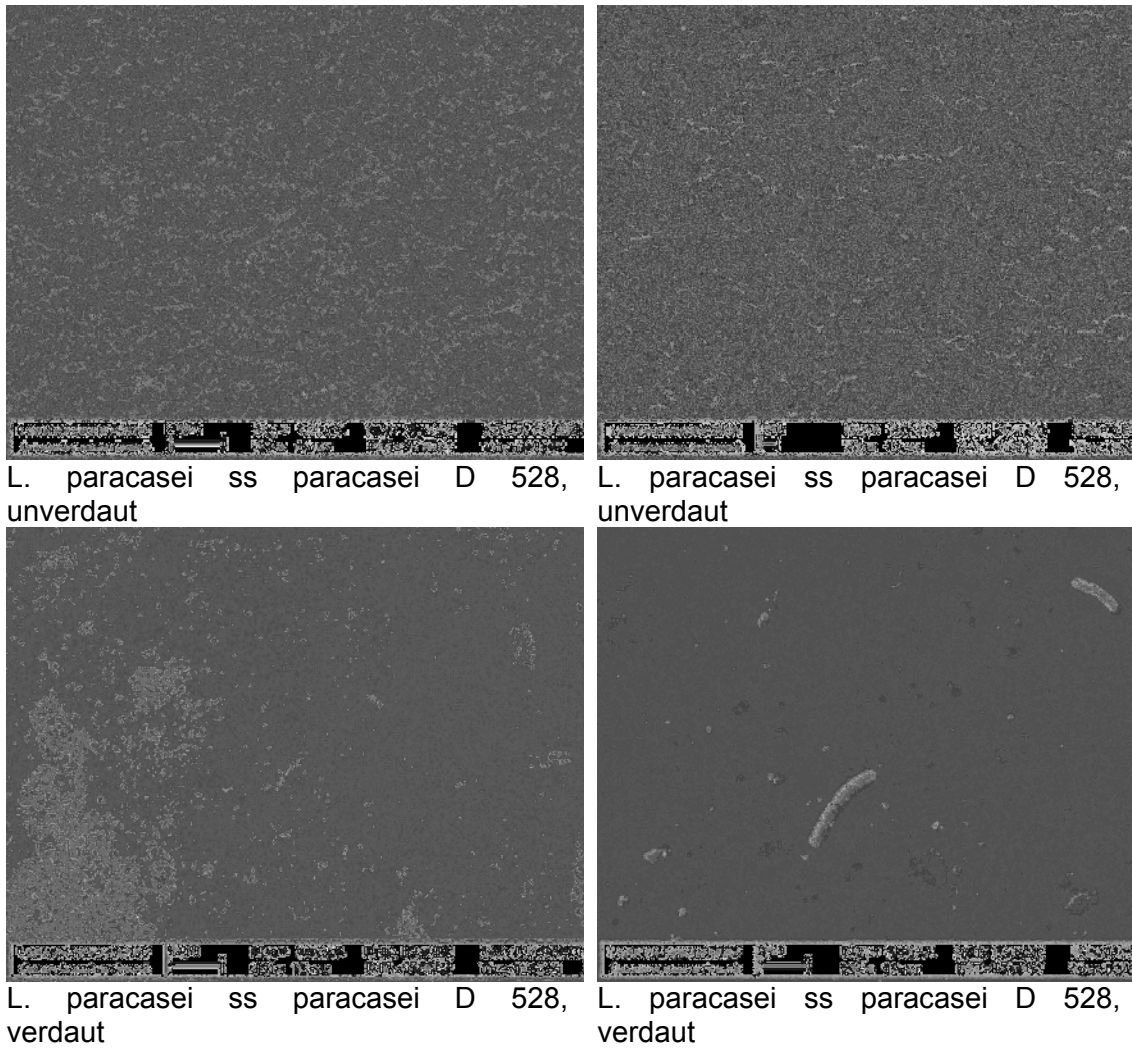


Abbildung 34: *L. paracasei* ss *paracasei* D 528 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- sowie 3000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

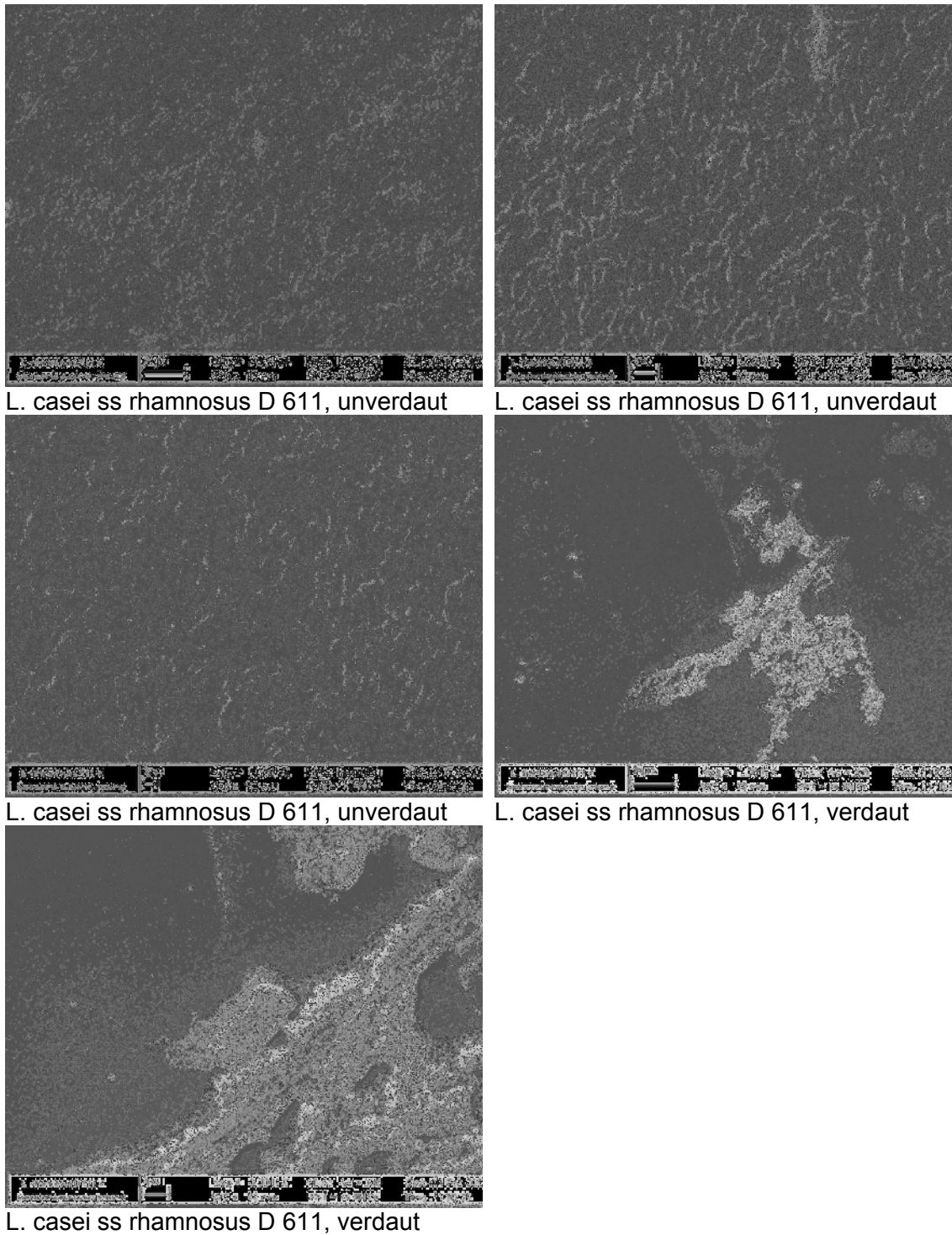


Abbildung 35: *L. casei* ss rhamnosus D 611 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- sowie 3000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

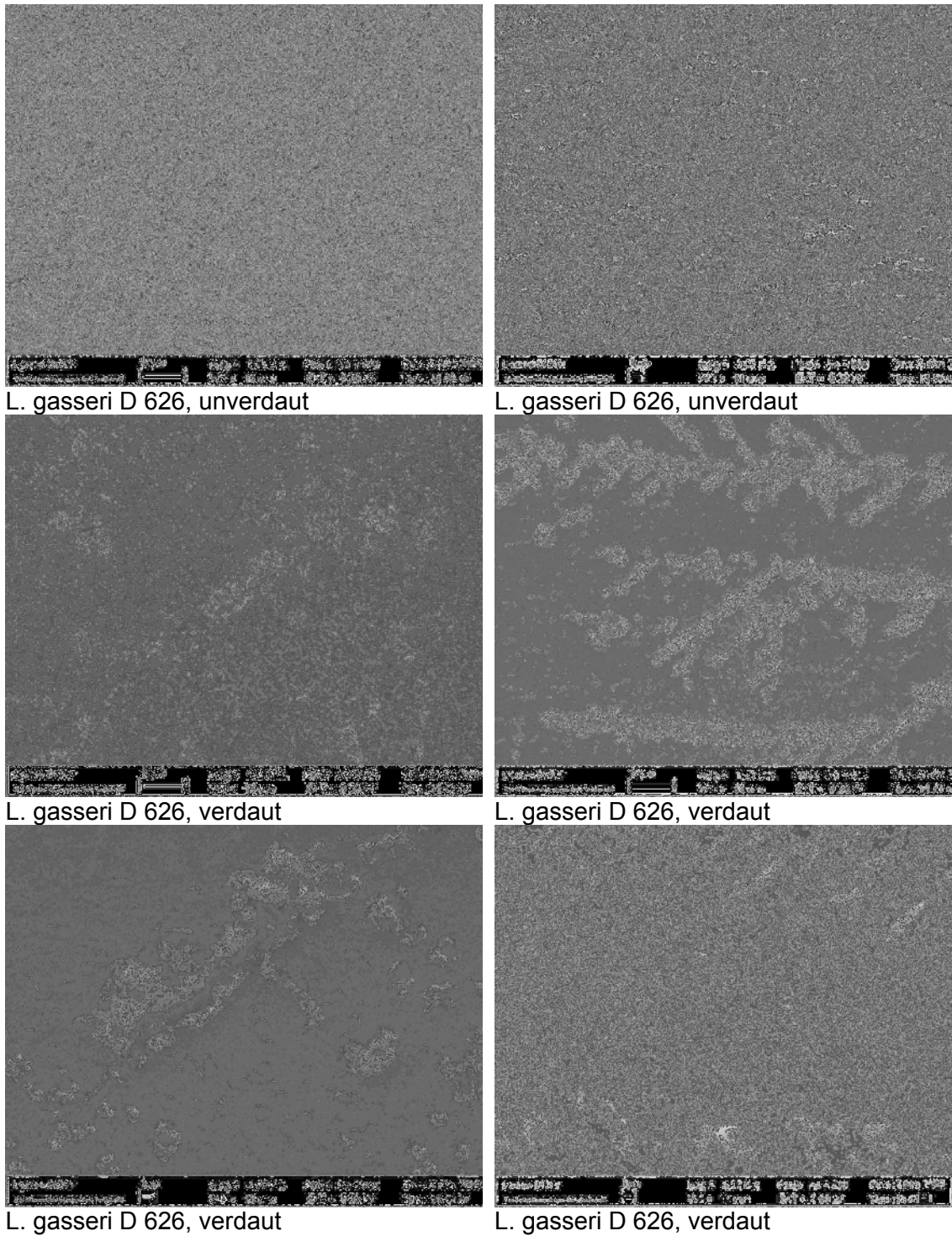


Abbildung 36: *L. gasseri* D 626 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- sowie 3000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

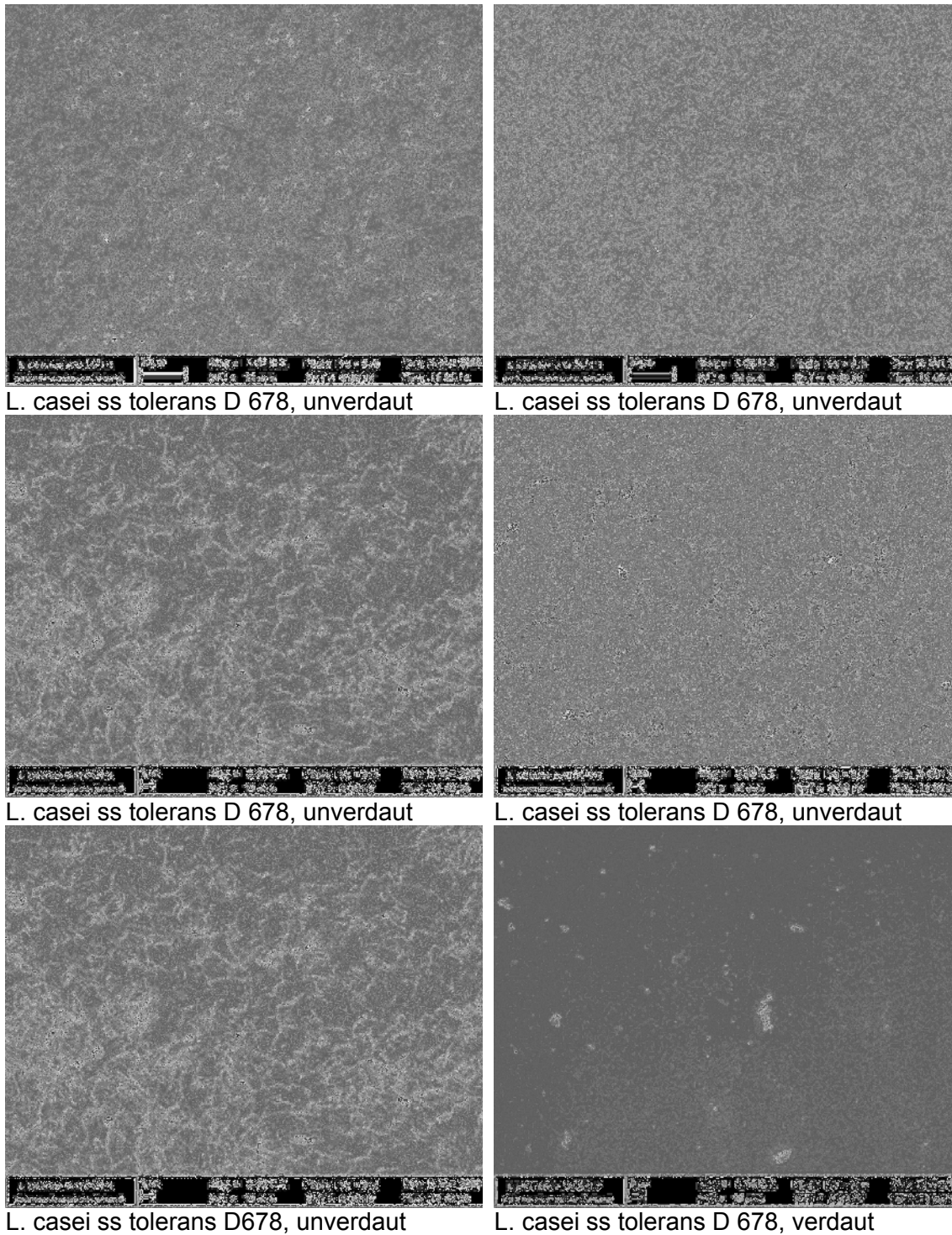
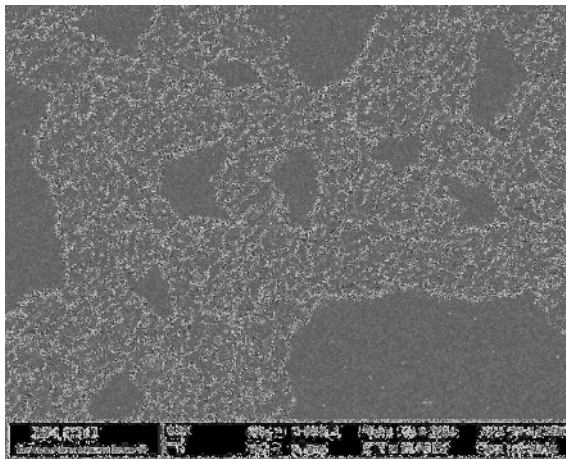
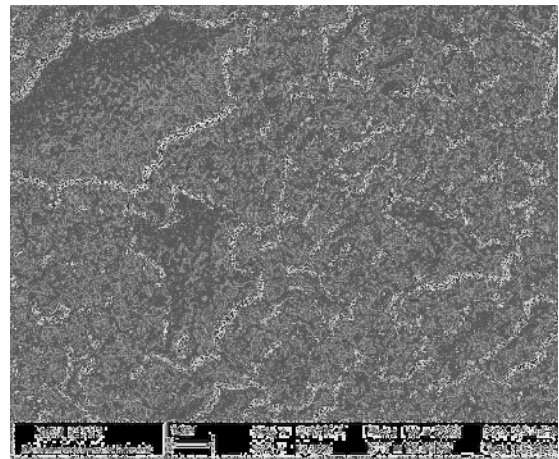


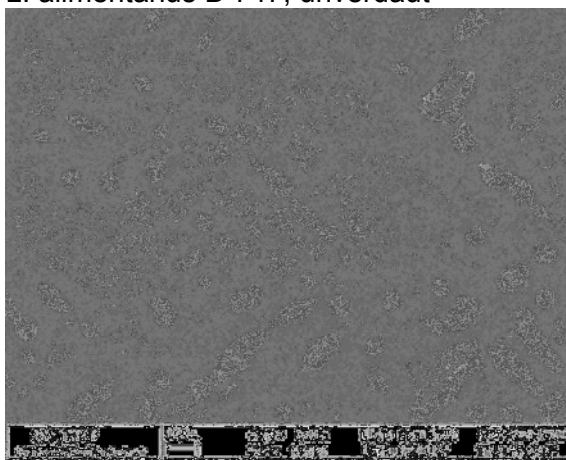
Abbildung 37: *L. casei* ss tolerans D 678 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 1000- sowie 3000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



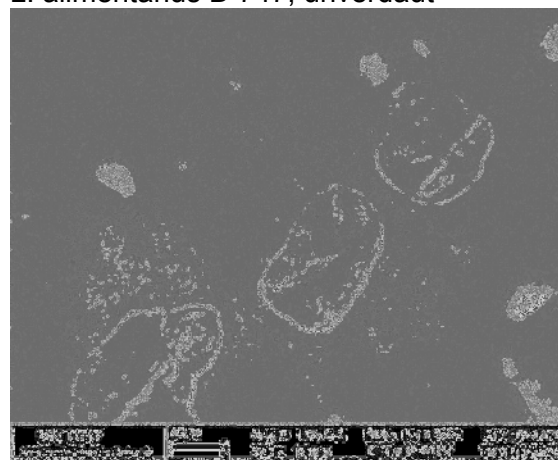
L. alimentarius D 747, unverdaut



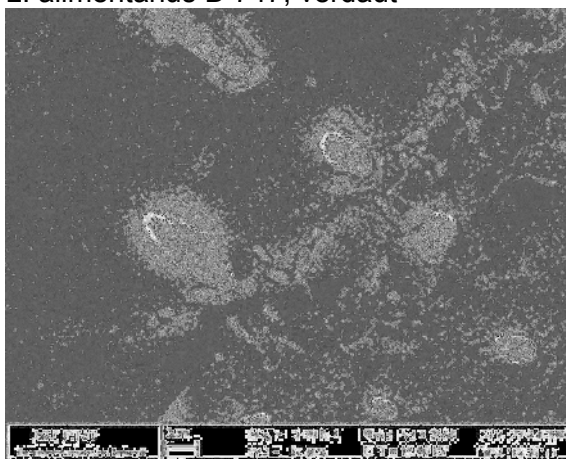
L. alimentarius D 747, unverdaut



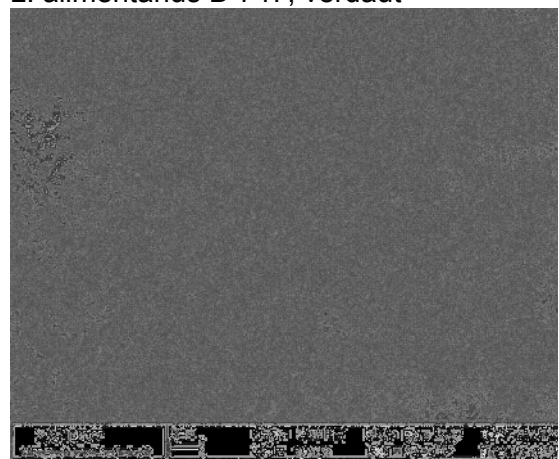
L. alimentarius D 747, verdaut



L. alimentarius D 747, verdaut



L. alimentarius D 747, verdaut



L. alimentarius D 747, verdaut

Abbildung 38: D 747 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 600- bis 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

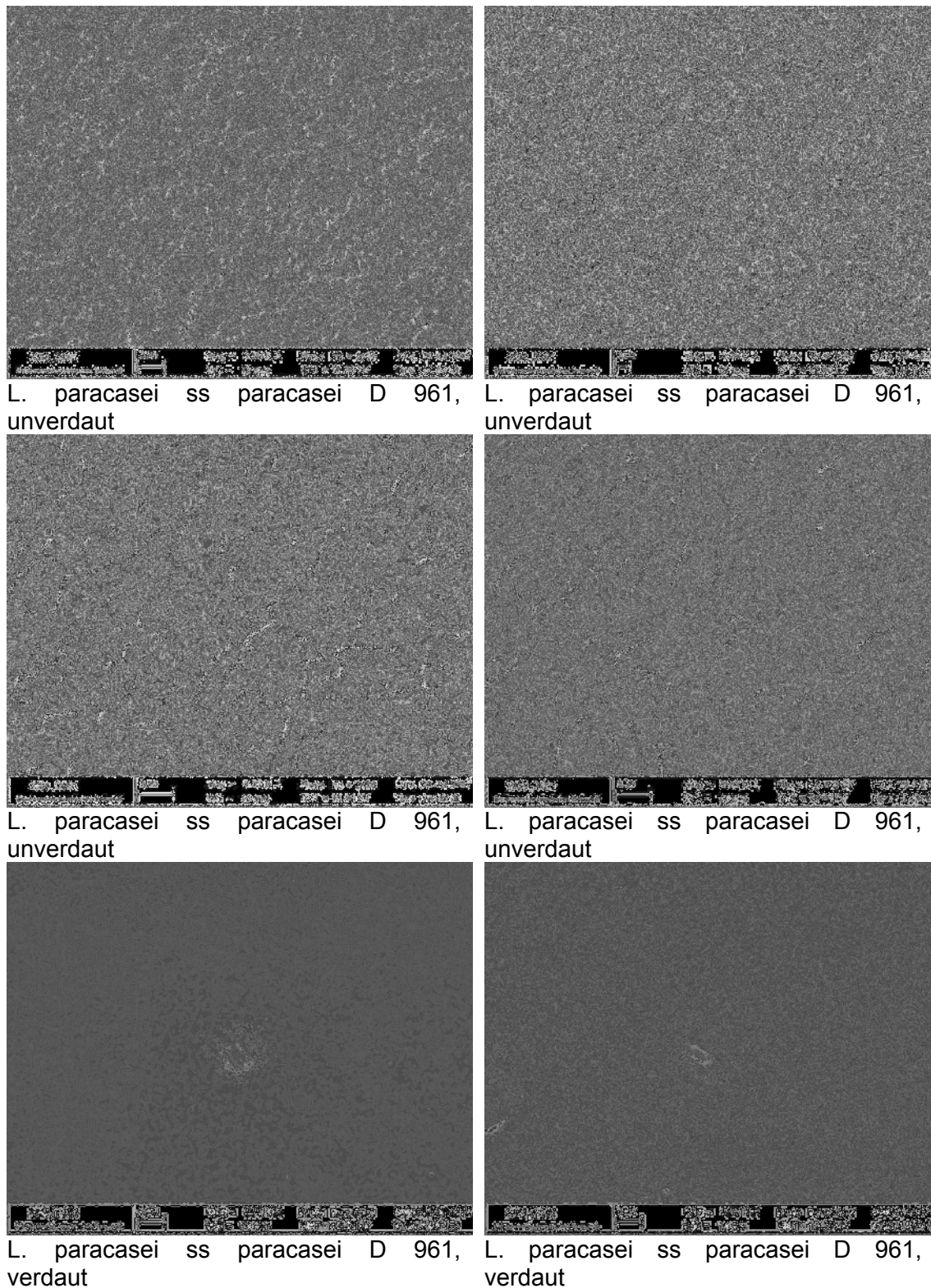
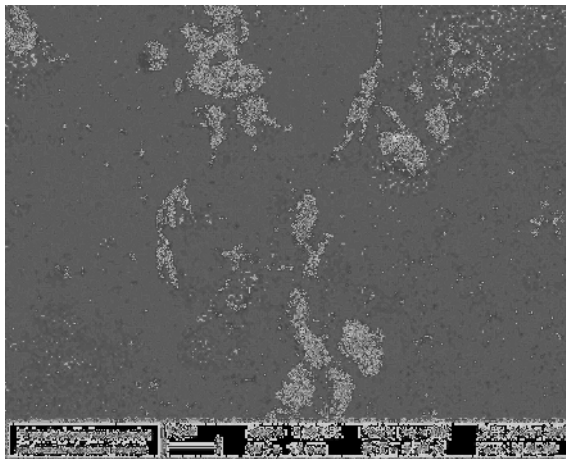
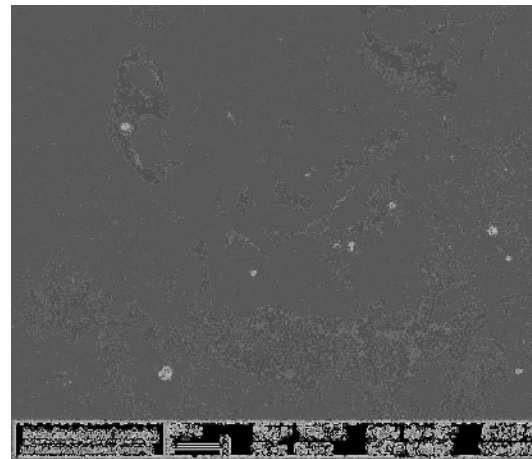


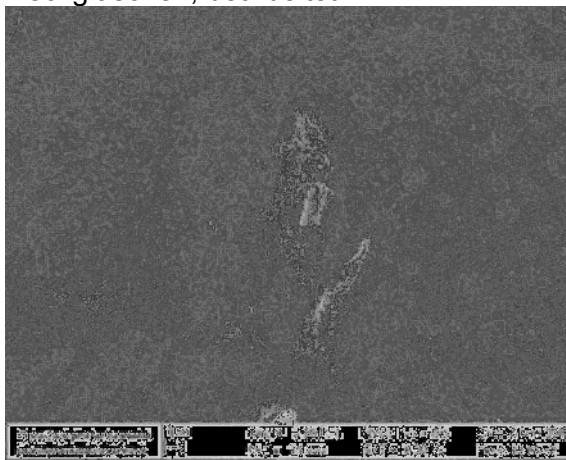
Abbildung 39: *L. paracasei* ss *paracasei* D 961 vor und nach enzymatischem Verdau mit Trypsin über 2h bei 37 °C mit 3000- sowie 8000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



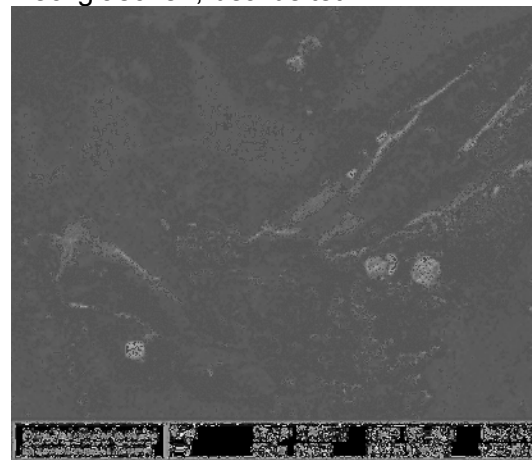
Deckgläschen, bearbeitet



Deckgläschen, bearbeitet

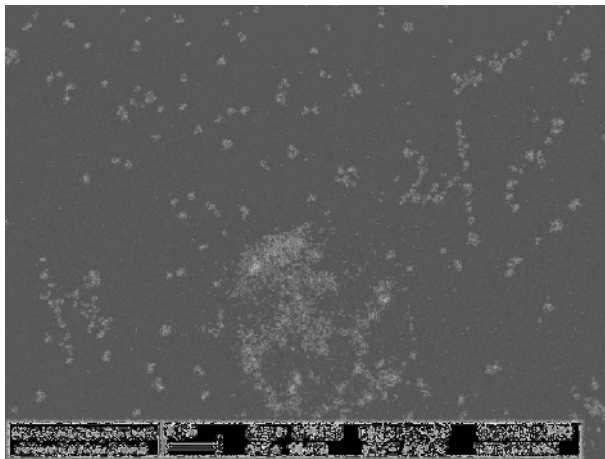


Deckgläschen, bearbeitet

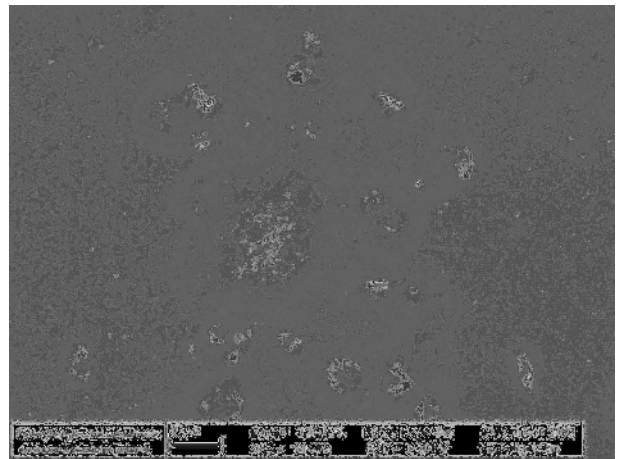


Deckgläschen, bearbeitet

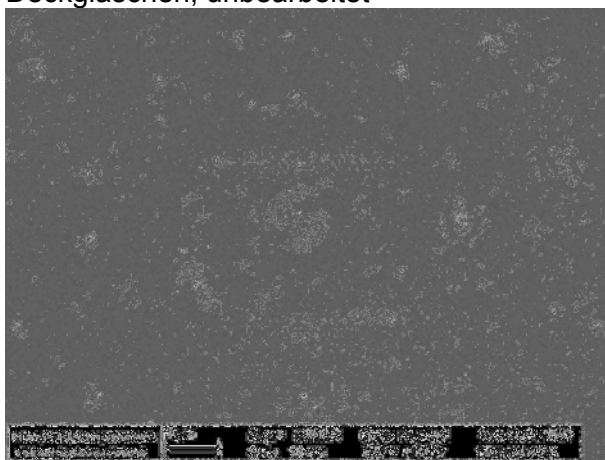
Abbildung 40: Deckgläschen mit aufgebracht Trypsinlösung mit 1000- sowie 3000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild



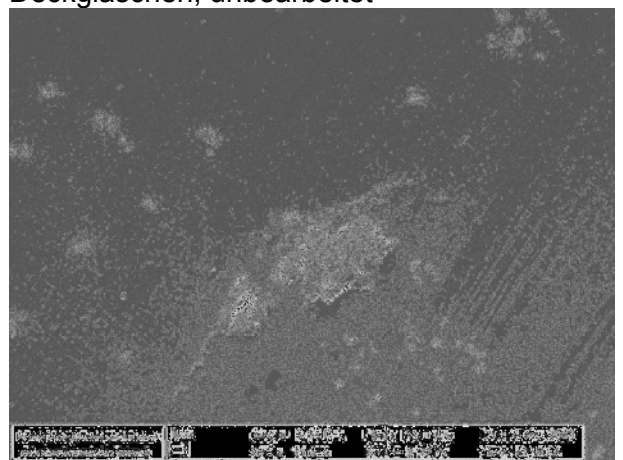
Deckgläschen, unbearbeitet



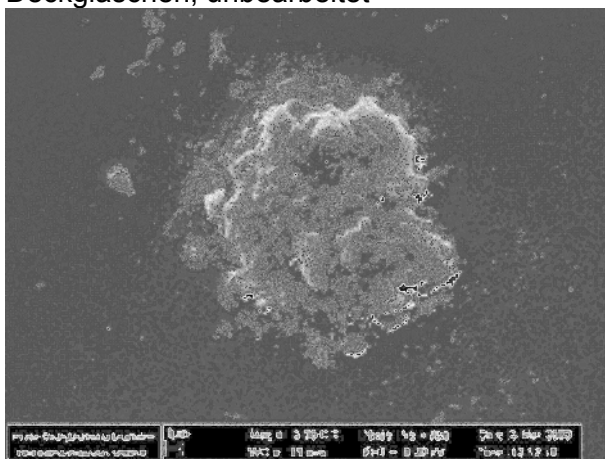
Deckgläschen, unbearbeitet



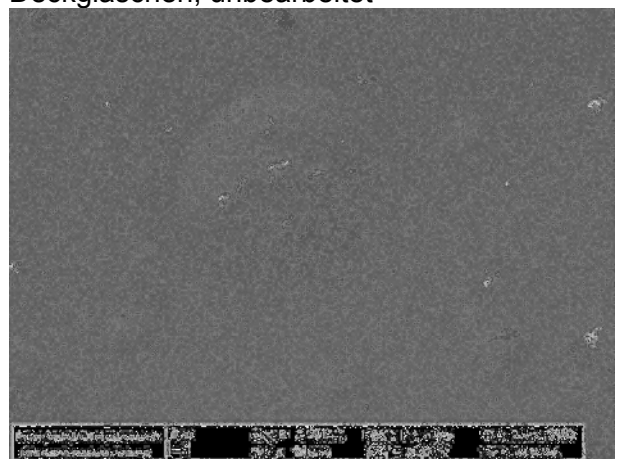
Deckgläschen, unbearbeitet



Deckgläschen, unbearbeitet



Deckgläschen, unbearbeitet



Deckgläschen, unbearbeitet

Abbildung 41: Unbearbeitetes Deckgläschen mit 1000- sowie 3000-facher Vergrößerung im rasterelektronenmikroskopischen Bild

Verwendete RezepturenPBS-Puffer

NaCl	8 g	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KCl	0,2 g	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	0,24 g	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Aqua destillata	1000 ml	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Verwendete Chemikalien

Ammoniumbikarbonat	Sigma, Milwaukee, USA
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Sigma, Milwaukee, USA
33%iges Acetylnitril	Sigma, Milwaukee, USA
0.5%ige Trifluoressigsäure	Sigma, Milwaukee, USA

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name:	Fiege
Vorname:	Thomas
Geburtsdatum:	20.02.1982
Geburtsort:	Arnsberg
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig
Wohnort:	Altstadt 2-4 95028 Hof

Schul Ausbildung

1988 – 1992	Gemeinschaftsgrundschule Brakel
1992 – 1998	Petrus-Legge-Gymnasium Brakel
1998 – 2001	Gymnasium St. Xaver Bad Driburg
Juni 2001	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Oktober 2001	Studium der Finanz- und Wirtschafts- mathematik an der Technischen Universität München
April 2002	Studium der Zahnheilkunde an der Ludwig- Maximilians-Universität München
Oktober 2004	Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum)
April 2005	Weiterführung des Studiums der Zahnheil- kunde an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Oktober 2005	Beginn der Promotion mit der Thematik „Zur Identifikation oraler Laktobazillen mit MALDI-TOF-MS“
Juni 2008	Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen)
November 2008	Approbation als Zahnarzt

Preise/Vorträge/Publicationen

April 2006	Adolph-Witzel-Stipendium der Thüringer Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde am Klinikum der FSU Jena e. V.
Januar 2007	Postervortrag „Zur Identifikation von oralen Laktobazillen mit MALDI-TOF-MS“ zur Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung der DGZMK in Mainz

Kneist S, Fiege T, Küpper H, Callaway A, Willershausen B, Schmidt F, Thiede B. 2008. Diversity of Lactobacilli in Deep Carious Lesions of Deciduous Molars. 55th ORCA Congress, 25.06.-28.06.2008, Groningen. Caries Res, 42(3):185-238.

Schmidt F, Fiege T, Hustoft HK, Kneist S, Thiede B. 2009. Shotgun mass mapping of *Lactobacillus* species and subspecies from caries related isolates by MALDI-MS. Proteomics, 9(7):1994-2003.

Berufstätigkeit

seit Januar 2009	Assistenz Zahnarzt in Hof Praxis Dr. med. dent. Bauer Blücherstraße 4 95028 Hof
------------------	--

Jena, den 10. August 2009

Thomas Fiege

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Frau Prof. Dr. rer. nat. habil. Susanne Kneist,

Herr Dr. rer. nat. Frank Schmidt,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe, und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 10. August 2009

Thomas Fiege

Danksagung

Frau Prof. Dr. Susanne Kneist, Biologisches Labor am Zentrum für ZMK des Universitätsklinikums Jena, danke ich herzlich für die Vergabe des Themas, die Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeit und die hilfreichen Diskussionen bei der Niederschrift der Arbeit.

Herrn Privatdozent Bernd Thiede und Herrn Dr. Frank Schmidt, Biotechnologiezentrum der Universität Oslo, danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen und ihr großes Interesse am Gelingen der Arbeit.

Herrn Dr. Schmidt bin ich ferner für zahlreiche und hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen bei der Niederschrift der Arbeit sehr verbunden.

Ebenfalls danke ich den Mitarbeiterinnen des Biologischen Labors am Zentrum für ZMK des Universitätsklinikums Jena, Frau Katrin von Brandenstein und Frau Regina Mäuer, für die Einführung in mikrobiologische Arbeitstechniken und die Beratung bei Auswertung und Darstellung des Daten- und Bildmaterials.

Frau Hanne Hustoft am Biotechnologiezentrum der Universität Oslo danke ich für die Einführung in die massenspektrometrischen Untersuchungsmethoden.

Frau Dipl. Ing. Renate Kaiser, Elektronenmikroskopisches Zentrum am Universitätsklinikum Jena, danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Der Thüringer Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena e.V. – unter dem Vorsitz von Herrn Privatdozent Dr. habil. Wilfried Reinhardt – danke ich für die finanzielle Förderung der Promotionsarbeit mit Gewährung des Adolph-Witzel-Stipendiums.